

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 340**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/42 (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01)
A61K 31/428 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2008 E 08742406 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 2139462**

54 Título: **Compuestos calcimiméticos para su uso en el tratamiento de trastornos intestinales**

30 Prioridad:

30.03.2007 US 921132 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2014

73 Titular/es:

AMGEN INC. (33.3%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US;
GEIBEL, JOHN PETER (33.3%) y
HEBERT, PATRICIA R. (33.3%)

72 Inventor/es:

GEIBEL, JOHN P.;
HEBERT, STEVEN C.;
MARTIN, DAVID y
RUSSELL, DEBORAH A.

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 449 340 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos calcimiméticos para su uso en el tratamiento de trastornos intestinales.

Esta invención se refiere en general al campo de la medicina y, más específicamente, a compuestos para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio del intestino (IBD), en el que el IBD es colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Chron (CD).

Aproximadamente 3,6 millones de personas en EE.UU. y en Europa (Lotus, E. (2004) *Gastroenterol.* 126: 1504-1517) y aproximadamente 15,8 millones de personas en todo el mundo tienen enfermedad inflamatoria del intestino o IBD (Lakatos, P. (2006) *World J. Gastroenterol.* 12(38): 6102-6108). IBD es un término colectivo usado para describir dos trastornos gastrointestinales de etiología desconocida; la enfermedad de Chron (CD) y la colitis ulcerosa (UC). Ambas enfermedades parecen resultar de la activación incontrolada de una respuesta inflamatoria en el intestino. La colitis ulcerosa se produce en el intestino grueso, mientras que la enfermedad de Chron puede implicar todo el tubo digestivo, así como los intestinos delgado y grueso. Se ha sugerido que la patogenia de IBD es multifactorial implicando genes de susceptibilidad y factores medioambientales. Sartor *et al.* (1997) *Am. J. Gastroenterol.* 92: 5S-11S. Aunque los agentes causantes desencadenantes siguen sin estar claros, el papel de una respuesta inmunitaria mucosa persistente y probablemente mal regulada es central en la patogenia de IBD. Sigue sin estar claro si la inflamación persistente, una característica intrínseca de IBD, refleja una aberración primaria en la respuesta mucosa o resulta de una estimulación persistente inapropiada. Curr. Opin. *Gastroenterol.* (2003) 19(4): 336-342. La evolución y el pronóstico de IBD varían ampliamente. Para la mayoría de los pacientes, es un estado crónico con síntomas que duran de meses a años. IBD es más común en adultos jóvenes, pero puede producirse a cualquier edad. Los síntomas clínicos de IBD incluyen hemorragia rectal intermitente, fiebre, dolor abdominal y diarrea, que pueden oscilar entre leve y grave. Signos comunes adicionales de IBD son anemia y pérdida de peso. Del 10 al 15% de todos los pacientes con IBD requerirán cirugía a lo largo de un periodo de diez años. La IBD prolongada es un factor de riesgo para el cáncer de colon y el riesgo comienza a aumentar significativamente tras de ocho a diez años de IBD.

La terapia de primera línea que se usa a menudo para IBD son los aminosalicilatos, que incluyen sulfasalazina y las marcas Asacol, Pentasa, Dipentum y Colazal. El tratamiento para la enfermedad de Chron adopta un enfoque gradual con aportes complementarios nutricionales y 5-ASA usado a menudo como terapia crónica dirigida a la profilaxis frente al empeoramiento de la enfermedad. Algunos médicos creen que los 5-ASA no son eficaces en CD y comienzan con un esteroide tal como budesonida. Cuando los pacientes con enfermedad de leve a moderada empeoran, a menudo se tratan con un ciclo corto de esteroides. Para los pacientes más graves o para aquellos con empeoramientos más frecuentes, se usan inmunosupresores tales como azatioprina (Imuran), 6-MP y metotrexato. También se usa un anticuerpo anti-TNF Remicade para tratar la enfermedad de Chron. El tratamiento de la colitis ulcerosa es muy similar al tratamiento de la enfermedad de Chron, siguiendo un enfoque gradual similar con el uso de 5-ASA, ciclos cortos de esteroides, otros inmunosupresores y cirugía. Remicade se usa a veces para la enfermedad grave que no responde a esteroides o moduladores inmunitarios tradicionales. Generalmente no se usa metotrexato y antibióticos en UC y muchos médicos creen que el metotrexato no funciona en UC. La necesidad de cirugía es más prevalente en UC que en CD, requiriendo finalmente un 25-40% de los pacientes colectomía. A diferencia de en la enfermedad de Chron, la cirugía para la colitis ulcerosa es curable. Hay necesidades aún por resolver para pacientes con IBD en los que no funciona ninguna de las terapias disponibles actualmente. Aproximadamente en el 20% de los pacientes no funciona ninguna terapia y necesitan cirugía a corto plazo, el 40% de los pacientes requerirá cirugía a largo plazo.

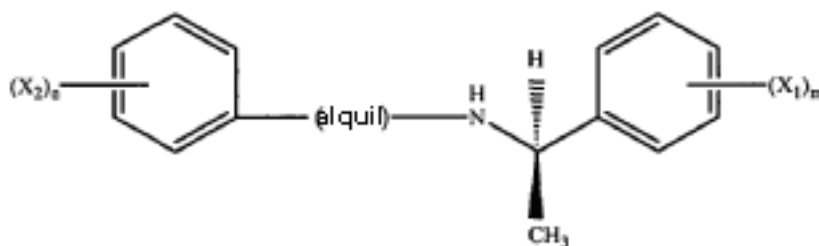
El síndrome del intestino irritable, o IBS, es la enfermedad digestiva más prevalente, que representa un 12% de las visitas a médicos de atención primaria y un 28% de derivaciones a gastroenterólogos. El IBS es uno de una familia heterogénea de trastornos gastrointestinales funcionales, que son difíciles de tratar porque no se conoce ninguna etiología para estos trastornos y por tanto el tratamiento se dirige al control de los síntomas. IBS afecta al menos a del 10 al 20% de los adultos en los EE.UU., en su mayor parte mujeres, y sólo es segundo tras el resfriado común como causa de absentismo laboral. La mayoría de los casos no se diagnostican porque sólo el 25-30% de los pacientes busca atención médica (International Foundation for Functional Gastrointestinal Disorders, Fundación internacional para trastornos gastrointestinales funcionales). IBS produce tasas de incapacidad iguales o superiores a las de la enfermedad gastrointestinal orgánica grave. Un estudio notificó que el 8% de los pacientes con IBS se jubila pronto debido a sus síntomas. Rees, G. *et al.* (1994) *J. R. Soc. Health* 114: 182. IBS se caracteriza por hábitos intestinales alterados y dolor abdominal, normalmente en ausencia de anomalías estructurales detectables. No existen marcadores de diagnóstico claros para IBS y su definición se basa en su presentación clínica. IBS se confunde a menudo con IBD, colitis, colitis mucosa, colon espástico o intestino espástico. Sólo recientemente los médicos comenzaron a considerar que IBS es un trastorno funcional cerebro-intestinal, más que una manifestación somática de estrés fisiológico. Pueden usarse los criterios diagnósticos Roma de IBS (actualmente, Roma II) para descartar otros trastornos. Según los criterios Roma II, el dolor o malestar abdominal es una característica clínica esencial de IBS. Drossman D. *et al.* (eds) *Rome II: the functional gastrointestinal disorders: diagnosis, pathophysiology, and treatment: a multinational consensus*. McLean, VA: Degnon Associates, 2000. La mayoría de los pacientes con IBS experimentan varios síntomas de IBS tales como dolor abdominal, hábitos intestinales alterados, flatulencia, síntomas GI superiores tales como dispepsia, ardor de estómago, náuseas y vómitos. Los pacientes con IBS normalmente se engloban en dos amplios grupos clínicos. La mayoría de los pacientes

pertenecen al primer grupo, presentándose con dolor abdominal asociado con hábito intestinal alterado que incluye estreñimiento y diarrea o estreñimiento y diarrea alternantes. El segundo grupo de pacientes tienen diarrea indolora. En general se cree que el sistema nervioso central desempeña un papel importante en la patogenia de IBS. Esto está apoyado por la asociación clínica de trastornos emocionales y estrés con empeoramiento de síntomas de IBS y la respuesta terapéutica a las terapias de IBS que actúan en sitios corticales cerebrales.

Aproximadamente el 80% de pacientes con IBS se tratan con alguna forma de terapia. El enfoque de tratamiento para IBS depende de los síntomas predominantes del paciente. El objetivo en pacientes con IBS con estreñimiento predominante (IBS-C) es estimular el movimiento intestinal, por tanto, pueden usarse laxantes con fibras en grandes cantidades varias veces por día. La terapia de segunda línea puede implicar Senekot y antiespasmódicos (por ejemplo, Levsin) para dolor abdominal y calambres periódicos. La terapia de tercera línea puede incluir Zelnorm. Habitualmente, el 40% de los pacientes con IBS-C mejoran con el tratamiento. En pacientes con IBS con diarrea predominante, debe descartarse primero intolerancia a la lactosa y crecimiento bacteriano en exceso. Imodium es el tratamiento convencional para este tipo de IBS. Lotronex se usa rara vez y se reserva sólo para pacientes muy graves debido al riesgo de colitis isquémica. El 60% de los pacientes IBS con diarrea predominante (IBS-D) mejoran con el tratamiento. Los pacientes con IBS con síntomas mixtos (IBS-A) pueden tratarse con una combinación de enfoques dependiendo de si el paciente está experimentando un periodo de estreñimiento o de diarrea. También es probable que una parte de estos pacientes sean pacientes con IBS-D o IBS-C que se medicaron en exceso y cambian hacia el otro extremo. La mayoría de los estudios a largo plazo de IBS notifican que los síntomas persisten durante más de cinco años en más del 75% de pacientes pese a la terapia apropiada.

Los trastornos intestinales tales como IBD e IBS constituyen un problema médico y son necesarios métodos mejorados de tratamiento ya que actualmente no hay tratamientos satisfactorios disponibles.

La presente invención se refiere a un compuesto calcimimético según la fórmula I para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio del intestino (IBD), en el que el IBD es colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Chron (DC)



en la que:

X_1 y X_2 , que pueden ser idénticos o diferentes, son cada uno un radical elegido de radicales CH_3 , CH_3O , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, Br , Cl , F , CF_3 , CHF_2 , CH_2F , CF_3O , CH_3S , OH , CH_2OH , CONH_2 , CN , NO_2 , CH_3CH_2 , propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, t-butilo, acetoxilo y acetilo, o dos de X_1 pueden formar juntos una entidad elegida de anillos cicloalifáticos condensados, anillos aromáticos condensados y un radical metilendioxilo, o dos de X_2 pueden formar juntos una entidad elegida de anillos cicloalifáticos condensados, anillos aromáticos condensados y un radical metilendioxilo; siempre que X_2 no sea un radical 3-t-butilo;

n oscila entre 0 y 5;

m oscila entre 1 y 5; y

el radical alquilo se elige de radicales alquilo C_1 - C_3 , que están opcionalmente sustituidos con al menos un grupo elegido de grupos alquilo C_1 - C_9 , grupos dihidroindolilo y tiodihidroindolilo y grupos 2-, 3- y 4-piperidinilo saturados e insaturados, lineales, ramificados y cíclicos;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las realizaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones dependientes.

En un aspecto, el sujeto puede ser un mamífero. En un aspecto, el sujeto puede ser un ser humano.

La figura 1 ilustra el efecto del compuesto B calcimimético sobre la inflamación colónica en modelo de colitis inducida por DSS al 5%. Panel A, colon proximal; panel B, colon medio, panel C, colon distal; panel D, colon combinado.

La figura 2 demuestra que los compuestos calcimiméticos compuesto C (panel A) y compuesto D (panel B) reducen las puntuaciones de inflamación en todas las partes del colon en comparación con el vehículo. Barras abiertas, vehículo; barras negras, agentes calcimiméticos.

La figura 3 ilustra los cambios en la corriente secretora de cortocircuito en ausencia y presencia de TTX 2 μ M, antes y después de la adición de 10 μ M de un compuesto A calcimimético, antes y después de la adición de bumetanida 100 μ M, un inhibidor de la secreción de cloruro.

5 La figura 4 ilustra los cambios en corriente secretora de cortocircuito en ausencia y presencia de 10 μ M de compuesto A, antes y después de la adición de TTX 2 μ M, antes y después de la adición de bumetanida 100 μ M.

La figura 5 representa la puntuación clínica en el día de estudio final (día 38) para los controles y el compuesto B. Las puntuaciones se calculan sumando la puntuación de deposición (0-4) y la puntuación de inflamación anal (0-4) y obteniendo el promedio de las puntuaciones para el grupo (la puntuación máxima es 8). Las barras de error representan el EEM.

10 La figura 6 representa un gráfico de la aparición de la enfermedad. La curva representa el porcentaje de ratones que muestran signos de colitis en diversos puntos de tiempo a lo largo del estudio. El día de aparición de la enfermedad se determina por un sujeto que tiene dos días consecutivos de puntuación clínica positiva. El grupo del compuesto B 10 mg/kg fue significativamente diferente del grupo control con vehículo.

15 La figura 7 ilustra la puntuación de histología. Las puntuaciones de histología representan las sumas de puntuaciones dadas a las tres secciones del colon tomadas: proximal, media y distal. El sistema de puntuación para cada sección se describe en los métodos. Las barras de error representan el EEM.

La figura 8 demuestra el efecto de los agentes calcimiméticos sobre el calcio (panel A) y el fósforo (panel B) séricos. Las barras de error representan el EEM.

20 La figura 9 demuestra el efecto de los agentes calcimiméticos sobre los niveles séricos de IP-10. Las barras de error representan el EEM.

I. Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “sujeto” se refiera a un ser humano, o a un animal, que necesita un tratamiento. Este sujeto puede tener, o estar en riesgo de desarrollar, un trastorno intestinal, por ejemplo, trastorno inflamatorio del intestino o síndrome del intestino irritable.

25 “Tratar” o “tratamiento” de una enfermedad incluye: (1) prevenir la enfermedad, es decir, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un sujeto que puede estar expuesto o haberse expuesto a la enfermedad o estados que pueden producir la enfermedad, o ser propenso a padecer la enfermedad pero que todavía no experimenta o muestra los síntomas de la enfermedad, (2) inhibir la enfermedad, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o de cualquiera de sus síntomas clínicos, o (3) aliviar la enfermedad, es decir, producir la regresión de la enfermedad o de cualquiera de sus síntomas clínicos.

La administración “en combinación con” o “junto con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea o concurrente y la administración consecutiva en cualquier orden.

35 La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” es la cantidad del compuesto de la invención que logrará el objetivo de mejora en la gravedad del trastorno y la frecuencia de la incidencia. La mejora en la gravedad del trastorno incluye la inversión de la enfermedad, así como la ralentización de la progresión de la enfermedad.

40 Tal como se usa en el presente documento, “receptor sensible a calcio” o “CaSR” se refiere al receptor acoplado a proteínas G que responde a cambios en los niveles extracelulares de calcio y/o magnesio. La activación del CaSR produce aumentos rápidos, transitorios, de la concentración citosólica de calcio movilizándolo de almacenes intracelulares sensibles a tapsigargina y aumentando el influjo de calcio a través de canales de calcio insensibles a voltaje en la membrana celular (Brown *et al.*, Nature 366: 575-580, 1993; Yamaguchi *et al.*, Adv Pharmacol 47: 209-253, 2000).

La expresión “trastornos intestinales” incluye pero no se limita a IBD, IBS, enfermedad diverticular, colitis colagenosa y linfática, colitis por derivación, endometriosis, tiflitis, colitis quística profunda, neumatosis cistoide intestinal y malacoplaua.

45 II. Compuestos calcimiméticos y composiciones farmacéuticas que los comprenden, administración y dosificación

A. Compuestos calcimiméticos, definiciones

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “compuesto calcimimético” o “agente calcimimético” se refiere a un compuesto que se une a receptores sensibles a calcio e induce un cambio conformacional que reduce el umbral para la activación del receptor sensible a calcio por el ligando endógeno Ca^{2+} . Estos compuestos calcimiméticos también pueden considerarse moduladores alostéricos de los receptores de calcio.

En un aspecto, un agente calcimimético puede tener una o más de las actividades siguientes: provoca un aumento transitorio en el calcio interno, teniendo una duración de menos de 30 segundos (por ejemplo, movilizándolo el calcio

interno); provoca un rápido aumento en $[Ca^{2+}]_i$, que se produce en el plazo de treinta segundos; provoca un aumento sostenido (mayor de treinta segundos) en $[Ca^{2+}]_i$ (por ejemplo, produciendo un influjo de calcio externo); provoca un aumento en los niveles de inositol-1,4,5-trifosfato o diacilglicerol, habitualmente en el plazo de menos de 60 segundos; e inhibe la formación de AMP cíclico estimulada por dopamina o isoproterenol. En un aspecto, el aumento transitorio en $[Ca^{2+}]_i$ puede suprimirse mediante el pretratamiento de la célula durante diez minutos con fluoruro de sodio 10 mM o con un inhibidor de fosfolipasa C, o el aumento transitorio se disminuye mediante el pretratamiento breve (no más de diez minutos) de la célula con un activador de proteína cinasa C, por ejemplo, miristato-acetato de forbol (PMA), mezereína o (-) indolactam V. En un aspecto, un compuesto calcimimético puede ser una molécula pequeña. En otro aspecto, un agente calcimimético puede ser un anticuerpo agonista frente a CaSR.

Los compuestos calcimiméticos útiles en la presente descripción incluyen los dados a conocer en, por ejemplo, las patentes europeas n.^{os} 637.237, 657.029, 724.561, 787.122, 907.631, 933.354, 1.203.761, 1.235.797, 1.258.471, 1.275.635, 1.281.702, 1.284.963, 1.296.142, 1.308.436, 1.509.497, 1.509.518, 1.553.078; las publicaciones internacionales n.^{os} WO 93/04373, WO 94/18959, WO 95/11221, WO 96/12697, WO 97/41090, WO 01/34562, WO 01/90069, WO 02/14259, WO 02/059102, WO 03/099776, WO 03/099814, WO 04/017908, WO 04/094362, WO 04/106280, WO 06/117211 ; WO 06/123725; WO 07/060026; WO 08/006625; WO 08/019690; las patentes estadounidenses n.^{os} 5.688.938, 5.763.569, 5.962.314, 5.981.599, 6.001.884, 6.011.068, 6.031.003, 6.172.091, 6.211.244, 6.313.146, 6.342.532, 6.362.231, 6.432.656, 6.710.088, 6.750.255, 6.908.935, 7.157.498, 7.176.322 y las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.^{os} 2002/0107406, 2003/0008876, 2003/0144526, 2003/0176485, 2003/0199497, 2004/0006130, 2004/0077619, 2005/0032796, 2005/0107448, 2005/0143426, la solicitud de patente europea PCT/EP2006/004166, la solicitud de patente francesa 0511940.

B. Métodos de evaluación de la actividad del agente calcimimético

En un aspecto, los compuestos que se unen al sitio de modulación de la actividad de CaSR pueden identificarse usando, por ejemplo, un compuesto marcado que se une al sitio en un formato de ensayo de unión de competición.

La actividad del agente calcimimético de un compuesto puede determinarse usando técnicas tales como las descritas en las publicaciones internacionales WO 93/04373, WO 94/18959 y WO 95/11211.

Otros métodos que pueden usarse para evaluar la actividad de compuestos calcimiméticos se describen a continuación.

Ensayo de células HEK 293

Se han descrito anteriormente en detalle células HEK 293 obtenidas por ingeniería genética para expresar CaSR paratiroideo humano (HEK 293 4.0-7) (Nemeth EF *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4040-4045). Esta línea celular clonal se ha usado ampliamente para examinar agonistas, moduladores alostéricos y antagonistas del CaSR (Nemeth EF *et al.* (2001) J. Pharmacol. Exp. Ther. 299:323-331).

Para las mediciones de la concentración citoplasmática de calcio, las células se recuperan de matraces de cultivo tisular mediante el tratamiento breve con ácido etilendiaminetetracético (EDTA) al 0,02% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se lavan y se resuspenden en Tampón A (NaCl 126 mM, KCl 4 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgSO_4$ 1 mM, K_2HPO_4 0,7 mM/ KH_2PO_4 , Na-Hepes 20 mM, pH 7,4) complementado con albúmina sérica bovina al 0,1% (BSA) y D-glucosa 1 mg/ml. Se cargan las células con fura-2 mediante incubación durante 30 minutos a 37°C en Tampón A y fura-2-acetoximetiléster 2 μ M. Se lavan las células con Tampón B (el Tampón B es Tampón A que carece de sulfato y fosfato y que contiene KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 0,5 mM complementado con BSA al 0,5% y D-glucosa 1 mg/ml) y se resuspenden hasta una densidad de 4 a 5 x 10⁵ células/ml a temperatura ambiente. Para registrar señales fluorescentes, se diluyen las células cinco veces en Tampón B precalentado (37°C) con agitación constante. Las longitudes de onda de excitación y emisión son de 340 y 510 nm, respectivamente. Se registra la señal fluorescente en tiempo real usando un registrador de banda.

Para el análisis de lector de placas por formación de imagen fluorométrica (FLIPR), se mantienen las células HEK 293 en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero bovino fetal al 10% (FBS) e higromicina 200 μ g/ml. A las 24 horas antes del análisis, se someten a tripsinización las células y se siembran en placa en el medio anterior a 1,2 x 10⁵ células/pocillo en placas de 96 pocillos, de lados negros, fondo transparente, recubiertas con colágeno 1. Se centrifugan las placas a 1.000 rpm durante 2 minutos y se incuban bajo CO₂ al 5% a 37°C durante la noche. Entonces se cargan las células con fluoro-3-acetoximetiléster 6 μ M durante 60 minutos a temperatura ambiente. Todos los ensayos se realizan en un tampón que contiene NaCl 126 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, Na-Hepes 20 mM, complementado con D-glucosa 1,0 mg/ml y fracción IV de BSA 1,0 mg/ml (pH 7,4).

En un aspecto, la EC₅₀ para los compuestos activos de CaSR puede determinarse en presencia de Ca^{2+} 1 mM. La CE₅₀ para la concentración citoplasmática de calcio puede determinarse partiendo de un nivel de Ca^{2+} extracelular de 0,5 mM. Se realizan experimentos de FLIPR usando un ajuste de láser de 0,8 W y una velocidad de disparador de cámara CCD de 0,4 segundos. Se exponen las células a calcio, compuesto activo a nivel del CaSR o vehículo (20 μ l) y se monitoriza la fluorescencia a intervalos de 1 segundo durante 4 a 50 segundos. Entonces puede realizarse

una segunda exposición (50 μ l) a calcio, compuesto activo a nivel del CaSR o vehículo y monitorizarse la señal fluorescente. Las señales fluorescentes se miden como la altura de pico de la respuesta dentro del periodo de muestra. Cada respuesta se normaliza entonces al pico máximo observado en la placa para determinar una fluorescencia máxima en porcentaje.

5 Células paratiroides bovinas

El efecto de los compuestos calcimiméticos sobre la regulación dependiente de CaSR de la secreción de PTH puede evaluarse usando cultivos primarios de células paratiroides bovinas disociadas. Las células disociadas pueden obtenerse mediante digestión por colagenasa, se reúne, luego se resuspenden en tampón de purificación Percoll y se purifican mediante centrifugación a 14.500 x g durante 20 minutos a 4°C. Las células paratiroides disociadas se extraen y se lavan en una mezcla 1:1 de F-12 de Ham y DMEM (F-12/DMEM) complementado con BSA al 0,5%, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 μ g/ml y gentamicina 20 μ g/ml. Finalmente se resuspenden las células en F-12/DMEM que contiene penicilina 10 U/ml, estreptomina 10 μ g/ml y gentamicina 4 μ g/ml, y se sustituye la BSA con ITS+ (insulina, transferrina, ácido selenioso, BSA y ácido linoléico; Collaborative Research, Bedford, MA). Se incuban las células en matraces T-75 a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire.

Tras el cultivo durante la noche, se extraen las células de los matraces por decantación y se lavan con tampón de células paratiroides (NaCl 126 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1 mM, K₂HPO₄ 0,7 mM/KH₂PO₄, Na-Hepes 20 mM, 20; pH 7,45 y cantidades variables de CaCl₂ según se especifique) que contiene BSA al 0,1% y CaCl₂ 0,5 mM. Se resuspenden las células en este tampón y se añaden porciones (0,3 ml) a tubos de poliestireno que contienen controles apropiados, compuesto activo a nivel del CaSR y/o concentraciones variables de CaCl₂. Cada estado experimental se realiza por triplicado. Las incubaciones a 37°C se realizan durante 20 minutos y pueden terminarse colocando los tubos en hielo. Se sedimentan las células mediante centrifugación (1500 x g durante 5 minutos a 4°C) y se someten a ensayo inmediatamente 0,1 ml de sobrenadante. Se deja una porción de las células en hielo durante el periodo de incubación y entonces se procesan en paralelo con otras muestras. La cantidad de PTH en el sobrenadante de los tubos mantenidos en hielo se define como "liberación basal" y se resta de otras muestras. La PTH se mide según las instrucciones del vendedor usando el kit de ensayo inmunorradiométrico de PTH-(1-34) de rata (Immunotopics, San Clemente, CA).

Liberación de calcitonina de células MTC 6-23

Se mantuvieron células MTC 6-23 de rata (clon 6), adquiridas de la ATCC (Manassas, VA) en medio de crecimiento (DMEM con alto contenido en glucosa con calcio/HIHS al 15%) que se reemplazó cada de 3 a 4 días. Se realiza un pase de los cultivos cada semana a una razón de división de 1:4. Se calcula que la concentración de calcio en el medio de crecimiento formulado es de 3,2 mM. Se incuban las células en una atmósfera del 90% de O₂/10% de CO₂, a 37°C. Antes del experimento, se aspiran células de cultivos subconfluentes y se aclaran una vez con disolución de tripsina. Se aspiran los matraces de nuevo y se incuban a temperatura ambiente con disolución de tripsina nueva durante 5-10 minutos para desprender las células. Se suspenden las células desprendidas a una densidad de 3,0 x 10⁵ células/ml en el medio de crecimiento y se siembran a una densidad de 1,5 x 10⁵ células/pocillo (0,5 ml de suspensión de células) en placas de 48 pocillos recubiertas con colágeno (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Se deja que las células se adhieran durante 56 horas tras la siembra, tras lo cual se aspiró el medio de crecimiento y se reemplazó por 0,5 ml de medio de ensayo (DMEM con alto contenido en glucosa sin/FBS al 2%). Se incuban entonces las células durante 16 horas antes de la determinación de la liberación de calcitonina estimulada por calcio. Se calcula que la concentración de calcio real en este medio es inferior a 0,07 mM. Para medir la liberación de calcitonina, se añaden 0,35 ml de agente de prueba en medio de ensayo a cada pocillo y se incuban durante 4 horas antes de la determinación del contenido de calcitonina en el medio. Se cuantifican los niveles de calcitonina según las instrucciones del vendedor usando un kit de ensayo inmunorradiométrico de calcitonina de rata (Immunotopics, San Clemente, CA).

Ensayo de inositol fosfato

También pudieron evaluarse las propiedades calcimiméticas de los compuestos en un ensayo bioquímico realizado en células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con un vector de expresión que contiene CaSR clonado de cerebro de rata [CHO (CaSR)] o no [CHO (WT)] (Ruat M. & Snowman AM., J. Biol. Chem 271, 1996, pág. 5972). Se ha demostrado que CHO (CaSR) estimulan la acumulación de inositol fosfato tritiado ([³H]IP) tras la activación del CaSR por Ca²⁺ y otros cationes divalentes y por NPS 568 (Ruat *et al.*, J. Biol. Chem 271, 1996). Por tanto, la acumulación de [³H]IP producida por 10 μ M de compuesto activo a nivel del CaSR en presencia de calcio extracelular 2 mM puede medirse y compararse con el efecto producido por calcio extracelular 10 mM, una concentración que provoca una activación de CaSR máxima (Dauban P. *et al*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 10, 2000, pág. 2001).

C. Composiciones farmacéuticas y administración

Pueden usarse compuestos calcimiméticos útiles en la presente invención en forma de sales farmacéuticamente aceptables derivadas de ácidos orgánicos o inorgánicos. Las sales incluyen las siguientes: acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato,

ciclopentanopropionato, dodecilsulfato, etanosulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactato, maleato, mandelato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 2-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, tosilato, mesilato y undecanoato. Cuando los compuestos de la invención incluyen una función ácida tal como un grupo carboxilo, entonces los expertos en la técnica conocen bien las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas para el grupo carboxilo e incluyen, por ejemplo, cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio, amonio cuaternario y similares. Para ejemplos adicionales de "sales farmacológicamente aceptables", véase Berge *et al.* J. Pharm. Sci. 66: 1, 1977. En determinadas realizaciones de la invención, pueden usarse sales de clorhidrato y sales de ácido metanosulfónico.

En algunos aspectos de la presente invención, el compuesto activo a nivel del receptor de calcio puede elegirse de cinacalcet, es decir, N-(1-(R)-(1-naftil)etil)-3-[3-(trifluorometil)fenil]-1-aminopropano, cinacalcet HCl y metanosulfonato de cinacalcet. El compuesto calcimimético, tal como cinacalcet HCl y metanosulfonato de cinacalcet, puede estar en diversas formas tales como polvos amorfos, polvos cristalinos y mezclas de los mismos. Los polvos cristalinos pueden estar en formas que incluyen polimorfos, pseudopolimorfos, hábitos cristalinos, micromeréticos y morfología de partícula.

Para la administración, los compuestos útiles en esta invención se combinan habitualmente con uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración indicada. Los compuestos pueden mezclarse con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanóicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, goma arábiga, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidina y/o poli(alcohol vinílico), y prepararse en comprimidos o encapsularse para su administración convencional. Alternativamente, los compuestos útiles en esta invención pueden disolverse en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma tragacanto y/o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración se conocen bien en la técnica farmacéutica. El portador o diluyente puede incluir material de retardo temporal, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar constituidas en una forma sólida (incluyendo gránulos, polvos o supositorios) o en una forma líquida (por ejemplo, disoluciones, suspensiones o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales, tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, tampones etc.

Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral pueden incluir cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, supositorios y gránulos. En tales formas farmacéuticas sólidas, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte, tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas farmacéuticas también pueden comprender, como en la práctica normal, substancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. Pueden prepararse adicionalmente comprimidos y píldoras con recubrimientos entéricos.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral pueden incluir emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como agua. Tales composiciones también pueden comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, edulcorantes, aromatizantes y de perfume.

La cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto activo a nivel del receptor de calcio en las composiciones útiles en la invención puede oscilar entre 0,1 mg y 180 mg, por ejemplo entre 5 mg y 180 mg, o entre 1 mg y 100 mg del compuesto calcimimético por sujeto. En algunos aspectos, la cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto activo a nivel del receptor de calcio en la composición puede elegirse de desde aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 1 mg, 5 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 180 mg.

Aunque puede ser posible administrar un compuesto activo a nivel del receptor de calcio a un sujeto solo, el compuesto administrado estará presente normalmente como principio activo en una composición farmacéutica. Por tanto, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto calcimimético, o una cantidad de dosificación eficaz de al menos un compuesto calcimimético.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad de dosificación eficaz" es una cantidad que proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto activo a nivel del receptor de calcio cuando se proporciona como una única dosis, en múltiples dosis o como una dosis parcial. Por tanto, una cantidad de dosificación eficaz del compuesto activo a nivel del receptor de calcio de la invención incluye una cantidad inferior, igual o superior a una cantidad eficaz del compuesto; por ejemplo, una composición farmacéutica en la que se requieren dos o más dosificaciones unitarias, tal como en comprimidos y cápsulas, para administrar una cantidad eficaz del compuesto, o alternativamente, una composición farmacéutica de múltiples dosis, tal como polvos, líquidos y similares, en la que

se administra una cantidad eficaz del compuesto calcimimético administrando una porción de la composición.

Alternativamente, una composición farmacéutica en la que se requieren dos o más dosificaciones unitarias, tal como en comprimidos y cápsulas, para administrar una cantidad eficaz del compuesto activo a nivel del receptor de calcio puede administrarse en menos de una cantidad eficaz durante uno o más periodos de tiempo (por ejemplo, una administración una vez al día y una administración dos veces al día), por ejemplo para determinar la dosis eficaz para un sujeto individual, para desensibilizar a un sujeto individual frente a posibles efectos adversos, para permitir un reajuste eficaz de la dosificación o la reducción de uno o más de otros agentes terapéuticos administrados a un sujeto individual y/o similares.

La cantidad de dosificación eficaz de la composición farmacéutica útil en la invención puede oscilar entre 1 mg y 360 mg de una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo aproximadamente 5 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 240 mg, aproximadamente 300 mg o aproximadamente 360 mg de una forma farmacéutica unitaria.

En algunos aspectos de la presente invención, las composiciones dadas a conocer en el presente documento comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activo a nivel del receptor de calcio para el tratamiento o prevención de trastornos intestinales. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el compuesto calcimimético tal como cinacalcet HCl puede estar presente en una cantidad que oscila entre el 1% y el 70%, tal como entre el 5% y el 40%, entre el 10% y el 30% o entre el 15% y el 20%, en peso en relación con el peso total de la composición.

Las composiciones útiles en la invención pueden contener uno o más principios activos además del compuesto activo a nivel del receptor sensible a calcio. El principio activo adicional puede ser otro compuesto calcimimético o puede ser un principio activo que tiene una actividad terapéutica diferente. Los ejemplos de tales principios activos adicionales incluyen vitaminas y sus análogos, tales como antibióticos, carbonato de lantano, agentes antiinflamatorios (esteroideos y no esteroideos) e inhibidores de citocina proinflamatoria (ENBREL®), KINERET®). Cuando se administran como una combinación, los agentes terapéuticos pueden formularse como composiciones separadas que se administran al mismo tiempo o a diferentes tiempos, o los agentes terapéuticos pueden administrarse como una única composición.

Las composiciones farmacéuticas útiles para los métodos dados a conocer en la presente memoria descriptiva pueden incluir compuestos adicionales tal como se describe en más detalle a continuación.

Los compuestos usados para poner en práctica los métodos de la presente memoria descriptiva pueden formularse para administración oral que libera principios biológicamente activos en el colon sin liberación sustancial en la parte superior del tubo digestivo, por ejemplo estómago e intestino. El suministro oral de fármacos al colon puede permitir lograr una alta concentración local mientras se minimizan los efectos secundarios que se producen debido a la liberación de fármacos en la parte superior del tubo digestivo o la absorción sistémica innecesaria. La ventaja del suministro colónico de fármacos puede deberse al hecho de que los fármacos escasamente absorbidos pueden tener una biodisponibilidad mejorada, el colon es un entorno algo menos hostil con menos diversidad e intensidad de actividad que el estómago y el intestino delgado, y el colon tiene un tiempo de retención más largo y parece que responde altamente a agentes que potencian la absorción de fármacos escasamente absorbidos. Chourasia, M. et al. (2003) J. Pharm. Pharmaceut. Sci 6(1): 33-66. Algunos enfoques farmacéuticos que pueden usarse para el desarrollo de sistemas de suministro de fármacos dirigidos al colon se resumen en la tabla 1.

Tabla 1

Enfoque	Características básicas
<i>Enlace covalente de un fármaco y un portador</i>	
Conjugados azo	El fármaco se conjuga con un enlace azo
Conjugados de ciclodextrina	El fármaco se conjuga con ciclodextrina
Conjugados de glicósido	El fármaco se conjuga con glicósido
Conjugados de glucoronato	El fármaco se conjuga con glucoronato
Conjugados de dextrano	El fármaco se conjuga con dextrano
Conjugados de polipéptido	El fármaco se conjuga con poli(ácido aspártico)
<i>Enfoques para suministrar la molécula intacta al colon</i>	
Recubrimiento con polímeros sensibles a pH	La formulación recubierta con polímeros entéricos libera el fármaco cuando el pH se acerca al intervalo alcalino
Recubrimiento con polímeros biodegradables	El fármaco se libera tras la degradación del polímero debido a la acción de bacterias colónicas
Inclusión en hidrogeles y matrices biodegradables	El fármaco incluido en matrices de polisacárido se libera mediante hinchamiento y mediante la acción biodegradable de los polisacáridos
Inclusión en matrices sensibles a pH	La degradación del polímero sensible a pH en el tubo

	digestivo libera el fármaco incluido
Sistemas liberados a lo largo del tiempo	Una vez que la formulación con recubrimiento múltiple pasa al estómago, el fármaco se libera tras un tiempo de demora de 3-5 h que es equivalente al tiempo de tránsito del intestino delgado
Polímeros sensibles a redox	El fármaco formulado con polímero azo y polímeros de disulfuro que responden selectivamente al potencial redox del colon proporciona suministro colónico
Sistemas bioadhesivos	El fármaco recubierto con un polímero bioadhesivo que proporciona selectivamente adhesión a la mucosa colónica puede liberar fármaco en el colon
Recubrimiento con micropartículas	El fármaco se une con micropartículas
Suministro de fármaco controlado de manera osmótica	El fármaco se libera a través de la membrana semipermeable debido a la presión osmótica
Supositorios	El fármaco se libera de partículas poliméricas microscópicas en las que el fármaco se incorpora de manera homogénea dentro de una base de supositorio farmacéuticamente aceptable

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse con el portador de fármacos que incluye pectina y galactomanano, polisacáridos que son ambos degradables por enzimas bacterianas colónicas (patente estadounidense n.º 6.413.494). Mientras que la pectina o el galactomanano, si se usan solos como portador de fármacos, se disuelven fácilmente en fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado, una mezcla de estos dos polisacáridos preparada a un pH de aproximadamente 7 o por encima produce un gel fuerte, elástico e insoluble que no se disuelve ni se disgrega en los fluidos gástrico e intestinal simulados, protegiendo así a los fármacos recubiertos con la mezcla de la liberación en la parte superior del tubo digestivo. Cuando la mezcla de pectina y galactomanano llega al colon, se degrada rápidamente por la acción sinérgica de las enzimas bacterianas del colon. Las composiciones de la invención pueden usarse con la matriz farmacéutica de un complejo de gelatina y un polisacárido aniónico (por ejemplo, pectinato, pectato, alginato, sulfato de condroitina, poli(ácido galactourónico), goma tragacanto, goma arábica y una mezcla de los mismos) que esgradable por las enzimas del colon (patente estadounidense n.º 6.319.518).

III. Compuestos para su uso

La presente memoria descriptiva da a conocer métodos para el tratamiento de trastornos intestinales. En un aspecto, los trastornos intestinales incluyen enfermedad inflamatoria del intestino. En otro aspecto, los trastornos intestinales incluyen síndrome del intestino irritable. En un aspecto adicional, los trastornos intestinales incluyen enfermedad diverticular, colitis colagenosa y linfática, colitis por derivación, endometriosis, tiflitis, colitis quística profunda, neumatosis cistoide intestinal o malacoplaquia.

IBD

La presente memoria descriptiva da a conocer un método de tratamiento o prevención de enfermedad inflamatoria del intestino. La enfermedad inflamatoria del intestino, o IBD, tal como se usa en el presente documento, es una enfermedad caracterizada por inflamación o ulceraciones en el intestino delgado y/o grueso con síntomas recurrentes de manera crónica de dolor abdominal y alteración en los hábitos intestinales. La IBD se ha clasificado en las categorías amplias de enfermedad de Chron (CD) y colitis ulcerosa (UC). Aunque los pacientes con CD y UC pueden presentarse con síntomas similares tales como diarrea y dolor abdominal, las diferencias características se enumeran en la tabla 2.

Tabla 2

Característica	Colitis ulcerosa	Enfermedad de Chron
Distribución	Afecta sólo al colon	Puede afectar a todo el tubo digestivo, aunque es más probable que afecte al intestino proximal
Patrón de inflamación	Continuo	Irregular en puntos de ulceración y tejido normal denominado inflamación intermitente ("skips")
Profundidad de inflamación	Enfermedad mucosa (úlceras poco profundas)	Enfermedad transmural (úlceras profundas)
Signos y síntomas	Hemorragia rectal, diarrea, tenesmo, dolor abdominal (hemorragia rectal siempre presente)	Diarrea, dolor abdominal, pérdida de peso. Puede asociarse con estenosis, fístulas, granulomas y úlceras perianales (puede producirse hemorragia rectal)

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar la UC según la reivindicación 1. Los compuestos para

el uso de la invención pueden usarse para el tratamiento de la CD según la reivindicación 1. En un aspecto, los compuestos para el uso de la presente invención dan como resultado la prevención de la aparición o el alivio de uno o más signos o síntomas de UC o CD. La tabla 3 resume adicionalmente los marcadores inflamatorios en patofisiología de IBD y los signos/síntomas encontrados comúnmente en colitis ulcerosa y enfermedad de Chron.

5

Tabla 3

Signo/síntoma	Colitis ulcerosa	Enfermedad de Chron
Área de tracto intestinal afectado	Cualquier parte del revestimiento más interno del colon, continua sin fragmentos de tejidos normales	Íleo inferior de la manera más común, pero puede empeorar en cualquier parte, incluyendo el colon, fragmentos de tejido normal entre áreas afectadas; puede afectar a toda la pared intestinal
Diarrea	Normalmente cuatro episodios por día	Normalmente cuatro episodios por día
Dolor / calambres abdominales	Sensibilidad a la presión leve, calambres abdominales inferiores	Sensibilidad a la presión abdominal de moderada a grave en el cuadrante inferior derecho
Sangre en las deposiciones	Presente; la cantidad depende de la gravedad de la enfermedad	Puede estar presente; la cantidad depende de la gravedad de la enfermedad
Fatiga	Resulta de pérdida de sangre excesiva y anemia	Resulta de pérdida de sangre excesiva, anemia y mala absorción de nutrientes
Fiebre	De grado bajo en casos graves	De grado bajo en casos graves
Exploración física	El examen rectal puede mostrar irritación perianal, fisuras, hemorroides, fístulas y abscesos	Irritación peritoneal, masa abdominal o pélvica
Pérdida de peso / anorexia	Pérdida de peso en casos más graves	Pérdida de peso y anorexia comunes debido a mala digestión y absorción intestinal
Apetito	A menudo disminuido durante periodos de empeoramiento de la enfermedad	A menudo disminuido durante periodos de empeoramiento de la enfermedad
Riesgo de cáncer	Aumentado	Aumentado

Para diagnosticar IBD, se elabora una historia clínica cuidadosa, incluyendo detalles y duraciones de síntomas y si hay una historia familiar de IBD o historia de tabaquismo. A continuación, los análisis de sangre pueden ayudar a detectar anemia, altos recuentos de glóbulos blancos (indicando inflamación o infección) y bajos niveles de nutrientes. Las muestras de deposiciones pueden descartar infección intestinal que puede conducir a síntomas similares a IBD. El diagnóstico de IBD se establece encontrando cambios característicos en el revestimiento del tracto intestinal mediante endoscopia y rasgos histológicos característicos, que pueden obtenerse mediante endoscopia. Los exámenes de rayos X tales como enemas de bario de doble contraste y bario oral con seguimiento de intestino delgado ("serie GI superior") se usan para confirmar el diagnóstico tras la endoscopia y examinar el grado de enfermedad mucosa. Ocasionalmente se ordenan exploraciones de TAC o de IRM para buscar complicaciones de IBD, tal como obstrucción. El área actual de investigación incluye pruebas genéticas y endoscopia por videocápsula. En la endoscopia por cápsula inalámbrica, se traga una píldora y se desplaza a través del intestino delgado tomando imágenes que se transmiten a un registrador y más tarde se visualizan en un ordenador. Esta prueba es más sensible para CD en el intestino delgado que los rayos X.

La presente memoria descriptiva da a conocer métodos para tratar la IBD leve. La presente memoria descriptiva da a conocer métodos para tratar la IBD moderada. La presente memoria descriptiva da a conocer métodos para tratar la IBD grave. La gravedad de la enfermedad inflamatoria del intestino se caracteriza en la tabla 4.

Tabla 4

	Leve	Moderada	Grave
Colitis ulcerosa	Menos de 4 deposiciones diarias Hemorragia intermitente Niveles de tasa de sedimentación de eritrocitos (VSE) y hematocrito normales	De 4 a 6 deposiciones diarias Hemorragia frecuente Hematocrito del 20 al 30% VSE de 20 a 30 mm/h	Más de 6 deposiciones sanguinolentas Hematocrito inferior al 30% Pérdida de peso mayor del 10% VSE > 30 mm/h
Enfermedad de Chron	Sin deshidratación ni obstrucción Pérdida de peso < 10%	Fiebre Anemia Pérdida de peso > 10%	Fiebre Obstrucción Absceso

Los compuestos para el uso de la presente invención pueden ponerse en práctica en combinación con tratamiento nutricional. Las deficiencias de nutrientes específicos en la IBD pueden tratarse mediante aporte complementario. Por ejemplo, pueden administrarse compuestos y composiciones calcimiméticos en combinación con calcio, magnesio, zinc, hierro, folato, vitamina B₁₂, vitamina D o vitamina K. En otro ejemplo, las composiciones y compuestos de la invención pueden administrarse de manera concurrente con terapia con colestiramina. En un aspecto, las composiciones y compuestos de la invención pueden administrarse con agentes antidiarréicos, antiespasmódicos o anticolinérgicos o analgésicos. Los ejemplos de agentes antidiarréicos incluyen loperamida o difenoxilato. Los ejemplos de agentes anticolinérgicos incluyen belladona, clidinio, bromuros de propanetelina y clorhidrato de dicitlomina. Puede elegirse un analgésico basándose en la gravedad de la enfermedad. En un aspecto, las composiciones y compuestos de la invención pueden administrarse junto con compuestos de ácido 5-aminosalicílico (5-ASA). Los ejemplos de preparaciones de 5-ASA incluyen supositorios de mesalamina (5-ASA), enemas de 5-ASA, sulfasalazina, asacol, pentasa, dipentum y colazol. En otro aspecto, las composiciones y compuestos de la invención pueden administrarse de manera concurrente con esteroides, tales como cortisona, enemas de corticosteroides, budesonida o prednisona. En un aspecto adicional, las composiciones y compuestos de la invención pueden administrarse junto con inmunomoduladores (es decir, fármacos que actúan bloqueando la proliferación, activación o mecanismos efectores de los linfocitos). Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen 6-mercaptopurina (6-MP), azatioprina, metotrexato, ciclosporina o anticuerpos anti-TNF tales como infliximab (Remicade®) o CDP571 (anticuerpo IgG4 humanizado frente a TNF- α). En otro aspecto de la invención, las composiciones y compuestos de la invención pueden administrarse de manera concurrente con antibióticos, tales como metronidazol o ciproflaxina. En un aspecto, las composiciones y compuestos de la invención pueden administrarse de manera concurrente con Humira®. En otro aspecto, las composiciones y compuestos de la invención pueden administrarse junto con CNTO-1275 (Centocor). En un aspecto adicional, las composiciones y compuestos de la invención pueden administrarse de manera concurrente con Basiliximab (Simulect), FK506 o sargramostim.

En un aspecto, las composiciones y compuestos de la invención pueden administrarse conjuntamente con tratamientos quirúrgicos. En otro aspecto, las composiciones y compuestos calcimiméticos de la invención pueden administrarse de manera concurrente con el tratamiento que implica citocinas recombinantes o anticuerpos frente a citocinas. En un aspecto, una terapia de combinación puede incluir IL-10 recombinante. En otro aspecto, las composiciones y compuestos calcimiméticos de la invención pueden usarse de manera concurrente con alimentos probióticos. En un aspecto adicional, los compuestos calcimiméticos de la presente invención pueden administrarse junto con compuestos o tratamientos que bloquean las propiedades proinflamatorias de motivos CpG, tales como CpG-ODN o AV-ODN (véase Obermeier, F. *et al.* (2005) *Gastroenterology* 129: 913-927; Obermeier, F. *et al.* (2005) *Gut* 54: 1428-1436). En otro aspecto, las composiciones y compuestos calcimiméticos de la invención pueden usarse con heparina, lidocaína o rosiglitazona.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar más completamente la invención.

Ejemplo 1

Este ejemplo explica resumidamente métodos y técnicas usados en la presente invención.

Modelos de ratón y rata con DSS de IBD

Animales. Se usaron ratones SJL/J hembra con edades comprendidas entre 8 y 10 para este estudio, adquiridos de Jackson Laboratories (Bar Harbour, ME). Se adquirieron ratas Sprague-Dawley hembra (de aproximadamente 150-300 gramos) de Charles River Laboratories Inc. (Wilmington, MA). Se alojaron ratones Mdr1a^{-/-} (FVB.129P2-Abcb1a^{tm1Bor}/N7), de 20-21 g de peso, de 8 semanas al inicio de los experimentos, y se mantuvieron (5 por jaula) en la instalación para animales en Amgen Washington. Se cuidó de todos los animales según los protocolos convencionales del Amgen Institutional Animal Care and Use Committee.

Reactivos químicos. Se adquirió sulfato sódico de dextrano (DSS) con masa molecular de 36-50 kDa de ICN Chemicals, Aurora, Ohio. Se preparó la disolución de DSS como una disolución al 5% p/v en agua estéril (Baxter Healthcare Corporation) y se filtró en condiciones estériles a través de un filtro de 0,45 μ m antes de añadirse al agua para beber. Se filtró de manera similar el agua para los grupos control negativo. Se usó FK506, (también conocido como tacrolímus, principio activo en Prograf®), nombre químico [3S-[3R*[E(1S*,3S*,4S*)],4S*,5R*,8S*,9E,12R*,14R*,15S*,16R*,18S*,19S*,26aR*)]-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-hexadecahidro-5,19-dihidroxi-3-[2-(4-hidroxi-3-metoxiciclohexil)-1-metiletetil]-14,16-dimetoxi-4,10,12,18-tetrametil-8-(2-propenil)-15,19-epoxi-3H-piridi[2,1-c][1,4]oxaazaclicotricosin-1,7,20,21(4H,23H)-tetrona monohidratada, como control positivo para el tratamiento de inflamación. Tacrolímus es un inmunosupresor macrólido producido por *Streptomyces tsukubaensis*. Se preparó la disolución de FK506 (Prograf®, Astellas) tal como sigue: se preparó una disolución 0,1 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) diluyendo la disolución madre 5 mg/ml. Se les dosificó a los animales FK506 a 1 mg/kg en 200 μ l de PBS.

La disolución de HEPES-Ringer contenía (en mmol/l): NaCl 125; KCl 5; MgCl₂ 0,5; HEPES 22, CaCl₂ 0,1 ó 1,6; glucosa 10, pH 7,4. Se burbujeó la disolución con O₂ al 100%. Se obtuvieron tetrodotoxina (TTX) y bumetanida (Bumet) de Sigma Chemical (St Louis, MO, EE.UU.) y se prepararon disoluciones madre en dimetilsulfóxido

(DMSO).

Se formularon disoluciones calcimiméticas (compuesto A, 3-(2-clorofenil)-N-((1R)-1-(3-(metiloxi)fenil)etil)-1-propanamina, compuesto B, (1R)-N-((6-(metiloxi)-4'-(trifluorometil)-3-bifenilil)metil)-1-feniletanamina, compuesto C, N-(2-cloro-5-(((1R)-1-feniletil)amino)metil)fenil)-5-metil-3-isoxazolcarboxamida y compuesto D, N-(2-cloro-5-(((1R)-1-feniletil)amino)metil)fenil)-2-piridincarboxamida) y se dosificaron en equivalentes de base libre a volúmenes determinados por el farmacólogo. El vehículo de formulación fue Captisol al 20% (p/v) (sal sódica de sulfobutil éter de β -ciclodextrina, calidad para investigación de CyDex, Inc.) en agua con un pH final de 2,0-2,2 a temperatura ambiente, ajustado con HCl y NaOH según se requiriese. Las concentraciones finales de DMSO nunca superaron el 0,1% (v/v). Los experimentos preliminares indicaron que el vehículo no alteró ningún parámetro electrofisiológico de nivel inicial.

Colitis por DSS en ratas. Se realizaron todos los experimentos en grupos de 6 ratas Sprague-Dawley macho, alojadas 2 por jaula. Para la inducción de la enfermedad, se les administró a las ratas DSS al 3% o al 5% a voluntad como agua para beber durante 8 días según Okayasu, *et al.* (1990) *Gastroenterology* 98: 694-702. Se preparó la disolución de DSS como una disolución al 3% p/v en agua estéril para irrigación, USP (Baxter Healthcare Corporation) y luego se filtró en condiciones estériles a través de un filtro de 0,45 mm antes de añadirse a la botella de bebida estéril para la jaula. El agua control se filtró y manejó de manera similar. Se les administró a los animales o bien agua para beber filtrada o bien agua que contenía DSS al 5% durante 8 días y se substituyó el agua en la botella de bebida por la disolución madre cada 3-4 días.

Colitis por DSS en ratones. Se realizaron todos los experimentos en grupos de 8 a 10 ratones SJL-J, alojados en la misma jaula. Para la inducción de la enfermedad, se les administró a los ratones DSS al 5% DSS a voluntad como agua para beber durante 9 días.

Evaluación post mortem. Se sacrificaron los ratones y las ratas mediante asfixia con CO₂. Se extirpó el intestino grueso de la canal, se evaluó para determinar lesiones macroscópicas y se sumergieron tres segmentos individuales no adyacentes del intestino grueso proximal, medio y distal de 2 centímetros de longitud en la fijación con formalina de zinc durante 24 horas. Al final de las 24 horas, se lavaron las secciones con agua del grifo y se colocaron en etanol al 70%. Entonces se cortó cada sección en trozos de 3 mm (9 trozos por animal), se procesaron en bloques de parafina y se cortaron las secciones en secciones de 5 μ m y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

En otros conjuntos de experimentos, se anestesiaron los animales mediante inhalación de isoflurano y se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se extirparon rápidamente segmentos de colon distal entre los ganglios linfáticos distales 1º y 2º, se cortaron a lo largo del borde mesentérico en una lámina plana y se lavaron con disolución de HEPES-Ringer basal helada que contenía Ca y Mg 0,1 mM. Se obtuvieron hasta cuatro de estas láminas colónicas no estriadas de cada animal.

Examen histomorfológico

Se puntuaron los cambios histopatológicos del intestino delgado y grueso proximales, medios y distales como una evaluación global de la inflamación basándose en infiltrado inflamatorio, edema, erosiones mucosas o ulceraciones tal como se describe en la tabla 6.

Tabla 6

Grado	Inflamación	Comentario
0	Ausente	Normal
1	Mínima	Ligero aumento en celularidad (principalmente linfocitos en la lámina propia)
2	Leve	Aumento en celularidad, neutrófilos presentes, edema leve.
3	Moderada	Aumento difuso en celularidad, erosiones focales o ulceraciones de la mucosa
4	Marcada	Celularidad aumentada, ulceraciones mucosas grandes y/o multifocales
5	Grave	Ulceración difusa, arquitectura mucosa perdida

Dieta de calcio

Todos los experimentos se realizaron en grupos de 6 ratas, alojadas 2 por jaula. Se precargaron los animales con una dieta que contenía calcio al 2, el 3 ó el 4% (la dieta normal contiene un 1,13% de calcio) durante 2 semanas. Para la inducción de la enfermedad, se les administró a las ratas DSS al 5% a voluntad como agua para beber durante 8 días comenzando el último día de la precarga de calcio. La dieta de calcio continuó durante toda la fase de DSS del estudio.

Formulaciones de dietas de nutrientes que contienen un agonista de poliamina o aminoácido del CaSR

Se alimentaron ratas Spargue-Dawley con o bien una "dieta con Ca²⁺ al 1%" control (Altromin, Alemania; que contenía calcio al 0,95% (p/p), triptófano al 0,2% (p/p); espermita al 0% (p/p)) o una "dieta con alto contenido en espermina" (Altromin, Alemania; que contenía calcio al 0,95% (p/p) calcio y espermina al 0,1% (p/p)) o bien una

“dieta con alto contenido en triptófano” (Altromin, Alemania; que contenía calcio al 0,95% (p/p), triptófano al 1,0% (p/p); espermina al 0% (p/p)) durante 2 semanas antes y también durante los periodos de tratamiento con DSS.

Medición de corriente de cortocircuito

Se montaron láminas no estriadas de colon o bien proximal o bien distal entre dos mitades de una cámara de Ussing modificada y se sometieron a cortocircuito mediante una fijación de voltaje (VCC MC6; Physiologic Instruments) con corrección para resistencia de la disolución. El área de exposición fue de 0,3 cm². Se introdujeron en baños las superficies mucosa y serosa del tejido en depósitos con 3-5 ml de disolución de HEPES-Ringer, pH 7,4 (37°C), mantenida a 37°C y se burbujeó de manera continua con O₂ al 100%. Se permitió que los tejidos tuvieran un mínimo de estabilización de 40 minutos y un periodo de registro basal antes de añadirse los fármacos directamente al lado apical o basolateral del epitelio. Se registraron las respuestas de manera continua y se adquirieron los datos a través de instrumentos DATAQ™ y se almacenaron en un PC y se procesaron usando el programa Acqualize™.

Análisis estadístico

Las puntuaciones de patología (0, 1, 2, 3, 4 y 5) se tratan como datos ordinales en el análisis. Se realizaron análisis de las comparaciones del agente calcimimético (compuesto A) frente a vehículo, agente calcimimético (compuesto A) frente a FK 506 y FK 506 frente a vehículo por separado de las dos formas siguientes. Se compararon las puntuaciones en los grupos en cada ubicación y a través de todas las ubicaciones, tratando las puntuaciones de tres ubicaciones como medidas repetidas. Se realizó el análisis para cada ubicación usando la prueba exacta de la chi-cuadrado de Mantel-Haenszel. Se realizó el análisis de medidas repetidas usando la ecuación de estimación generalizada (GEE). (Models for discrete longitudinal data; Geert Molenberghs y Geert Verbeke, Springer 9 2005, Capítulo 18.5).

Colitis en ratones *mdr1a*^{-/-}

Inducción de colitis

Se indujo colitis en ratones *mdr1a*^{-/-} hembra mediante infección con *Helicobacter bilis* a través de sonda nasogástrica oral. Se obtuvieron ratones *mdr1a*^{-/-} (FVB.129P2-*Abcb1a*^{tm1Bor} N7) de Taconic (Hudson, NY). Estos ratones desarrollan espontáneamente colitis, pero la inoculación con *H. bilis* puede inducir colitis más fuerte en un intervalo de tiempo más corto con una frecuencia superior de enfermedad. El protocolo usado en este estudio se modeló según el protocolo descrito por Maggio-Price *et al.* en 2002 (Am J Pathol. 160(2): 739-751).

Cultivo e infección de *H. bilis*

Se descongeló un vial de reserva congelado de *H. bilis* en una mezcla 1:1 de infusión de cerebro corazón:caldo de *Brucella* y se dispuso en franjas sobre placas de agar sangre. Se incubaron las placas durante 2 días a 37°C en una cámara microaeróbica que contenía una atmósfera del 90% de N₂, el 5% de H₂ y el 5% de CO₂. Al final de los 2 días de crecimiento estático, se recogieron las bacterias de la placa de agar sangre y se colocaron en matraces Erlenmeyer que contenían caldo de *Brucella* complementado con FBS al 5%. Se mantuvo este cultivo líquido con agitación constante durante 24 horas a 37°C en una cámara microaerobia. Tras el cultivo líquido, se concentraron las bacterias mediante centrifugación y se resuspendieron en caldo de *Brucella*. Se examinaron las bacterias mediante tinción de Gram para determinar la morfología y se realizaron otras pruebas para confirmar la presencia de actividad peroxidasa, oxidasa y ureasa. Se determinó la concentración bacteriana midiendo la densidad óptica a 600 nm (1 DO₆₀₀ ~ 10⁸ UFC/ml). Se diluyeron las bacterias hasta una concentración de 10⁸/ml y se suministraron mediante sonda nasogástrica oral 100 µl (10⁷ bacterias) a 40 ratones *mdr1a*^{-/-}. Como control, se les dosificó a 5 ratones *mdr1a*^{-/-} 100 µl de caldo de *Brucella*, pero no se trataron adicionalmente con ningún compuesto experimental. Se realizaron infecciones con *H. bilis* al comienzo del estudio (día 0) y se repitieron una semana después (día 7).

Tratamiento

Se asignaron grupos de tratamiento por jaula, no por aleatorización de ratones individuales; por tanto, todos los ratones en una jaula dada recibieron el mismo tratamiento. Los grupos estaban igualados estrechamente en peso en el día 0 del estudio. Se trataron los ratones v.o. diariamente con el compuesto calcimimético, R-compuesto B, a dosis de 10 mg/kg o 3 mg/kg. Para los controles, se usaron 100 µl de vehículo o 10 mg/kg del enantiómero menos activo del compuesto B, S-compuesto B. Se administraron todos los tratamientos en 100 µl de vehículo comenzando en el día 1. Como control positivo, se trataron ratones por vía i.p. una vez por semana con 250 µg de CTLA4-Fc en 100 µl de PBS comenzando en el día 1. Se generaron todos los compuestos experimentales en Amgen.

Diseño de grupos de tratamiento

Tabla 7

Grupo n.º	Tratamiento	N.º de ratones	Día 0 Peso medio	Vía	Nivel de dosis	de	Conc (ml/ml)	Volumen (ml)	Programa de
-----------	-------------	----------------	---------------------	-----	----------------	----	--------------	--------------	-------------

			± EEM (g)		(mg/kg) ^b		dosificación ^d		
1	No recibió tratamiento ^a	5	21,04 0,31	± NA ^c	NA	NA	0,1	NA	
2	CTLA4-Fc	5	19,92 1,21	± i.p.	0,0125	2,5	0,1	1x/semana	
3	Vehículo	10	21,88 0,41	± v.o.	NA	NA	0,1	7x/semana	
4	S-Comp. B	5	20,16 0,52	± v.o.	10	2	0,1	7x/semana	
5	R-Comp. B	10	21,20 0,49	± v.o.	10	2	0,1	7x/semana	
6	R-Comp. B	10	21,01 0,26	± v.o.	3	0,6	0,1	7x/semana	

^aLos animales que no recibieron tratamiento se infectaron de manera control con caldo de *Brucella*, pero no recibieron tratamiento experimental

^bBasado en un ratón de 20 g

^cNo aplicable

5 ^dLa dosificación comenzó en el día 1

Evaluación de la colitis

Se monitorizó a los ratones al menos 3 veces por semana para determinar signos clínicos de colitis. Los criterios de puntuación clínica consistieron en dos partes: consistencia fecal e inflamación anal. La consistencia fecal se puntuó tal como sigue: 0 = deposición normal, 1 = ano sucio, 2 = deposición blanda o húmeda, 3 = diarrea, 4 = deposición sanguinolenta. Se puntuó la inflamación anal tal como sigue: 0 = sin inflamación, 1 = inflamación leve, 2 = inflamación moderada, 3 = inflamación grave, 4 = recto prolapsado. Se sumaron las puntuaciones individuales para cada ratón y el total se notificó como la puntuación clínica (máximo de 8).

Procedimientos de autopsia

15 Se realizó la autopsia a todos los ratones en el día 38 tras la inoculación inicial. Se sacrificaron los ratones mediante asfixia con CO₂. Se obtuvo sangre mediante punción intracardiaca y se recogió en tubos separadores de suero. Se recogió el suero y se almacenó a -80°C. Se disecaron los cólores por debajo del ciego y justo por encima del ano, y se extrajo el contenido de la luz. Se fijaron secciones de las regiones del colon proximal, media y distal en formalina tamponada neutra al 10% para el análisis histopatológico.

Análisis del suero. Química clínica y quimiocinas

20 Se realizó el análisis de química clínica del suero en el dispositivo Olympus AU400 usando pruebas y protocolos convencionales. Se realizaron mediciones de calcio y fósforo en suero no diluido para todas las muestras. Se sometieron a ensayo las citocinas y quimiocinas séricas mediante en inmunoensayo múltiple de citocinas/quimiocinas de ratón Lincoplex (Millipore; Billerica, MA) según las instrucciones del fabricante.

Histología

25 Se colocaron porciones del colon proximal, medio y distal en formalina tamponada neutra al 10%, se procesaron y se incluyeron en parafina usando prácticas de histología de rutina. Se prepararon portaobjetos teñidos con hematoxilina y eosina usando protocolos de histología de rutina. Se evaluó una sección de 5 µm por muestra de colon y se puntuó usando los criterios de Maggio-Price *et al.* de 2002 (citado anteriormente): 0 = sin inflamación; 1 = inflamación leve limitada a la mucosa; 2 = inflamación moderada en mucosa y submucosa; 3 = inflamación grave con obliteración de la arquitectura normal, erosiones superficiales y/o abscesos crípticos; 4 = inflamación grave con obliteración de la arquitectura normal, erosiones superficiales y/o abscesos crípticos más ulceración mucosa. Para cada animal, la puntuación de histología es el total de las puntuaciones de secciones individuales.

Análisis estadístico

35 Se expresaron los resultados para los analitos séricos como la media ± error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA unidireccional con prueba posterior de Tukey usando el programa GraphPad Prism. Se usó un valor de p de 0,05 en el cálculo para determinar si había diferencias significativas entre dos grupos cualesquiera. Se expresaron los resultados para la aparición de la enfermedad como una curva de supervivencia patrón. Se realizó una prueba de rangos logarítmicos (Mantel-Cox) usando el programa GraphPad Prism para determinar la significación. Se usó un valor de p de 0,05 en el cálculo para determinar si había diferencias significativas entre dos grupos cualesquiera. Se expresaron los resultados para la puntuación clínica y la puntuación de histología como la media ± EEM. Se realizó una prueba de puntuación media de Cochran-Mantel-Haenszel usando el software SAS. Se

usó un valor de p de 0,05 en el cálculo para determinar si había diferencias significativas entre dos grupos cualesquiera.

Ejemplo 2

5 Este experimento demuestra el efecto de compuestos calcimiméticos sobre la inflamación en el modelo de ratón de IBD inducida por DSS.

Para la inducción de la enfermedad, se les administró a los ratones tratados DSS al 5% en agua a voluntad como agua para beber durante 9 días tal como se describe en el ejemplo 1 y se trataron de manera simultánea por vía oral durante ese periodo con uno de los tratamientos enumerados en la tabla 8.

Tabla 8

DSS al 5%	Tratamiento	Dosis	Vía
no	No tratados (normales)	n/a	n/a
sí	Compuesto B calcimimético	10 mg/kg	oral
sí	FK 506	1 mg/kg	oral
sí	Captisol (vehículo)	200 µl	oral

10 La figura 1 y la tabla 8 resumen el efecto del compuesto B calcimimético sobre la inflamación colónica en la colitis inducida por DSS al 5%. Se sacrificaron los animales con dióxido de carbono en el día nueve tras el tratamiento. Se extirpó el intestino grueso (colon) y se procesó para determinar cambios histopatológicos de los segmentos proximal, medio y distal tal como se describe en el ejemplo 1. Se puntuó el intestino como una evaluación global de la inflamación basándose en infiltrado inflamatorio, edema, erosiones mucosas o ulceraciones tal como se indica en la

15 La figura 1 y la tabla 8 resumen el efecto del compuesto B calcimimético sobre la inflamación colónica en la colitis inducida por DSS al 5%. Se sacrificaron los animales con dióxido de carbono en el día nueve tras el tratamiento. Se extirpó el intestino grueso (colon) y se procesó para determinar cambios histopatológicos de los segmentos proximal, medio y distal tal como se describe en el ejemplo 1. Se puntuó el intestino como una evaluación global de la inflamación basándose en infiltrado inflamatorio, edema, erosiones mucosas o ulceraciones tal como se indica en la

20 El tratamiento de ratones SJL/J hembra con DSS al 5% a voluntad en su agua para beber durante 9 días indujo cambios inflamatorios histomorfológicos detectables en todos los segmentos del intestino grueso (figura 1, paneles A, B y C, animales tratados con vehículo). El tratamiento con 10 mg/kg de compuesto B dio como resultado una media disminuida de manera estadísticamente significativa en las puntuaciones inflamatorias del intestino grueso en los segmentos distal ($p < 0,05$, figura 1C), medio ($p < 0,01$, figura 1B) y combinado ($p < 0,01$, figura 1D) en comparación con el grupo de vehículo Captisol. Cuatro de los diez animales tratados con agente calcimimético carecieron de cambios inflamatorios, lo que indica que su colon era normal (tabla 9). Adicionalmente, el tratamiento con compuesto B dio como resultado una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la puntuación inflamatoria media en segmentos colónicos combinados en comparación con el tratamiento con FK 506 (control positivo, tabla 9).

Tabla 9

DSS al 5%	Tratamiento	Dosis	Animales con inflamación colónica/animales totales
no	No tratados (normales)	n/a	0/10
sí	Compuesto B	10 mg/kg	6/10
sí	FK 506	1 mg/kg	10/10
sí	Captisol (vehículo)	200 µl	10/10

30 En un estudio separado, se evaluaron compuestos calcimiméticos que se ha demostrado que no se absorben fácilmente a partir del intestino en el torrente sanguíneo (compuestos C y D) sobre la inflamación colónica de ratón en colitis inducida por DSS al 5%. Se sacrificaron los animales con dióxido de carbono en el día nueve tras el tratamiento. Se extirpó el intestino grueso (colon) y se procesó para determinar cambios histopatológicos de los segmentos proximal, medio y distal tal como se describe en el ejemplo 1. Se puntuó el intestino como una evaluación global de la inflamación basándose en infiltrado inflamatorio, edema, erosiones mucosas o ulceraciones tal como se indica en la tabla 6. Se puntuaron todas las muestras de forma ciega.

Tabla 10

DSS al 5%	Tratamiento	Dosis	Vía
no	No tratados (normales)	n/a	n/a
sí	Compuesto C	30 mg/kg	oral
sí	Compuesto D	30 mg/kg	oral
sí	Captisol (vehículo)	200 µl	oral

35 El tratamiento de ratones SJL/J hembra con DSS al 5% a voluntad en su agua para beber durante 9 días indujo cambios inflamatorios histomorfológicos detectables en todos los segmentos del intestino grueso (figura 2A, animales tratados con vehículo Captisol – barras blancas). El tratamiento con 30 mg/kg de compuesto C dio como resultado disminuciones en las puntuaciones inflamatorias medias del intestino grueso en los segmentos de colon distal (49%, $p < 0,05$), medio (20%), proximal (15%) y combinado (30%) (figura 2A, barras negras) en comparación

con el grupo de vehículo Captisol (barras blancas).

El tratamiento con 30 mg/kg de compuesto D dio como resultado disminuciones en las puntuaciones inflamatorias medias del intestino grueso en los segmentos distal (68%; $p < 0,01$), medio (29%), proximal (44%; $p < 0,05$) y combinado (48%; $p < 0,05$) en comparación con el grupo de vehículo Captisol (figura 2B, animal tratado con vehículo Captisol, barras blancas; animales tratados con compuesto D calcimimético, barras negras). Dos de ocho animales tratados con compuesto D carecían de cambios inflamatorios, lo que indica que su colon era normal.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que los compuestos calcimiméticos inhiben la actividad del sistema nervioso entérico. Para evaluar la relevancia funcional del CaSR en el sistema nervioso entérico (SNE), particularmente en su capacidad para inhibir la respuesta secretora a secretagogos liberados a partir de la actividad del SNE, se determinó el efecto de la activación de CaSR sobre la corriente secretora de cortocircuito basal en láminas colónicas no estriadas de rata montadas en cámaras de Ussing antes o después del bloqueo de la actividad nerviosa del SNE por el inhibidor de canales de sodio activados por voltaje, tetrodotoxina, TTX.

La figura 3 resume los cambios en la corriente secretora de cortocircuito en ausencia y presencia de TTX 2 μM , antes y después de la adición de 10 μM de un compuesto A calcimimético, antes y después de la adición de bumetanida 100 μM , un inhibidor de la secreción de cloruro. Se muestran rectas representativas de los cambios temporales en una corriente de cortocircuito para el colon proximal (panel A) y distal (panel C) antes y después de la adición de los agentes indicados mediante flechas. TTX inhibió la corriente de cortocircuito secretora durante a lo largo de 15 minutos. La adición posterior de compuesto A o bumetanida (Bumet) no tuvo ningún efecto adicional sobre la corriente de cortocircuito. Se resumen las velocidades de cambio en la corriente de cortocircuito ($\mu\text{A}/\text{cm}^2 \text{ min.}$) inducidas por la adición de estos agentes para las láminas de colon proximal (panel B) y distal (panel D). El número entre paréntesis indica el número de observaciones.

La figura 4 resume los cambios en la corriente secretora de cortocircuito en ausencia y presencia de 10 μM de compuesto A, un agente calcimimético, antes y después de la adición de TTX 2 μM , un inhibidor de la actividad del SNE, antes y después de la adición de bumetanida 100 μM , un inhibidor de la secreción de cloruro. Se muestran rectas representativas de los cambios temporales en la corriente de cortocircuito para el colon proximal (A) y distal (C) antes y después de la adición de los agentes indicados mediante flechas. El compuesto A inhibió la corriente de cortocircuito secretora a lo largo de 15 minutos. La adición posterior de TTX o bumetanida (Bumet) no tuvo ningún efecto adicional sobre la corriente de cortocircuito. Se resumen las velocidades de cambio en la corriente de cortocircuito ($\mu\text{A}/\text{cm}^2 \text{ min.}$) inducidas por la adición de estos agentes para las láminas de colon proximal (panel B) y distal (panel D). El número entre paréntesis indica el número de observaciones.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra que el agente calcimimético R-compuesto B atenúa el desarrollo de colitis en ratones *mdr1a*^{-/-}.

En el día final del estudio, el 50% de los ratones en el grupo control de vehículo mostró síntomas clínicos de enfermedad y todos estos animales tuvieron puntuación clínicas ≥ 6 (figura 5). Sólo un animal en el grupo tratado con S-compuesto B tuvo síntomas clínicos y tuvo una puntuación de 4, lo que sugiere enfermedad moderada. En cada uno de los grupos de tratamiento con R-compuesto B, sólo un animal mostró signos clínicos de enfermedad en el día final del estudio. De los animales tratados con R-compuesto B que mostraron síntomas clínicos, ninguno tuvo una puntuación de inflamación anal superior a moderada y ningún animal desarrolló diarrea. Ha de observarse que el grupo con 10 mg/kg de compuesto B tuvo puntuaciones clínicas significativamente inferiores que el grupo con vehículo ($p < 0,05$). Los animales no infectados y los tratados con CTLA4-Fc no mostraron síntomas clínicos a lo largo de todo el estudio.

La aparición de la enfermedad comenzó en el día 14 en el grupo tratado con vehículo y, hacia el fin del estudio, la mitad de los ratones tratados con vehículo estaban enfermos (figura 6). El grupo de S-compuesto B comenzó a mostrar síntomas en el día 27, momento en el que dos animales tenían signos clínicos de enfermedad. La enfermedad persistió hasta el final del estudio sólo en uno de estos animales. Un animal tratado con 3 mg/kg de R-compuesto B comenzó a mostrar signos clínicos de colitis en el día 17. Un segundo animal desarrolló signos de enfermedad en el día 31, pero esto no persistió hasta el final del estudio. Un animal del grupo de 10 mg/kg comenzó a mostrar síntomas clínicos en el día 32 y fue el único ratón en este grupo que parecía colítico. Hubo una diferencia estadísticamente significativa en la aparición de la enfermedad entre el grupo control de vehículo y el grupo con 10 mg/kg de R-compuesto B (valor de $p = 0,04$). Conjuntamente, estos datos sugieren fuertemente que el tratamiento con R-compuesto B retrasó la aparición de colitis y redujo la gravedad de la enfermedad.

Análisis post mórtem

El examen histológico demostró que 10 animales en el estudio tuvieron evidencia de colitis (tabla 11).

Tabla 11

Resultados de histopatología de S08M-00850

Grupo 1 => No infectado/no tratado												
Hallazgos microscópicos	N. ^{os} de animales =>	1	2	3	4	5						Media de segmento
Inflamación GI												
LI PROXIMAL		0	0	0	0	0						0,00
LI MEDIO		0	0	0	0	0						0,00
LI DISTAL		0	0	0	0	0						0,00
Puntuación de LI total (Máx. = 12)		0	0	0	0	0						
Puntuación de Li promedio		0										
Grupo 2 => 250 µg de CTLA4-Fc												
Hallazgos microscópicos	N. ^{os} de animales =>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media de segmento
Inflamación GI												
LI PROXIMAL		0	0	0	0	0						0,00
LI MEDIO		0	0	0	0	0						0,00
LI DISTAL		0	0	0	0	0						0,00
Puntuación de LI total (Máx. = 12)		0	0	0	0	0						
Puntuación de Li promedio		0										
Grupo 3 => 100 µl de vehículo solo												
Hallazgos microscópicos	N. ^{os} de animales =>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media de segmento
Inflamación GI												
LI PROXIMAL		0	3	0	3	tnp	0	0	3	3	3	1,67
LI MEDIO		0	4	0	3	tnp	0	0	3	3	3	1,78
LI DISTAL		0	3	0	3	tnp	0	0	3	3	3	1,67
Puntuación de LI total (Máx. = 12)		0	10	0	9		0	0	9	9	9	
Puntuación de Li promedio		5,1										
Grupo 4 => S-B 10 mg/kg v.o. diarios												
Hallazgos microscópicos	N. ^{os} de animales =>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media de segmento
Inflamación GI												
LI PROXIMAL		0	3	0	0	0						0,60
LI MEDIO		0	3	0	0	0						0,60
LI DISTAL		0	3	0	0	0						0,60
Puntuación de LI total (Máx. = 12)		0	9	0	0	0						
Puntuación de Li promedio		1,8										
Grupo 5 => R-B 10 mg/kg v.o. diarios												
Hallazgos microscópicos	N. ^{os} de animales =>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media de segmento
Inflamación GI												
LI PROXIMAL		2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,40
LI MEDIO		0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,20
LI DISTAL		0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0,30
Puntuación de LI		2	0	0	0	7	0	0	0	0	0	

total (Máx. = 12)												
Puntuación de Li	0,9											
promedio												
Grupo 6 => R-B 3 mg/kg v.o. diarios												
N. ^{os} de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media de	
animales =>											segmento	
Hallazgos												
microscópicos												
Inflamación GI												
LI PROXIMAL	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0,40	
LI MEDIO	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0,60	
LI DISTAL	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0,60	
Puntuación de LI	0	0	0	0	8	0	0	0	8	0		
total (Máx. = 12)												
Puntuación de Li	1,6											
promedio												

Los criterios de puntuación se describen en el ejemplo 1. Se sumaron las puntuaciones de cada sección del colon para generar una puntuación de intestino grueso (LI) total. La puntuación de LI máxima para cada ratón fue 12. Los ratones 3-5 se encontraron muertos en su jaula, por lo que el tejido no estaba presente (tnp).

En el grupo tratado con vehículo, 5 de 9 animales (55%) tenían colitis, mientras que 2 de 10 animales (20%) en cada uno de los grupos tratados con R-compuesto B tenían patología de colon (figura 7). Las puntuaciones del intestino grueso (LI) totales de los ratones colíticos en el grupo de vehículo fueron todas ≥ 9 , mientras que las puntuaciones de los animales tratados con R-compuesto B fueron 8, 8, 7 y 2. Conjuntamente, estos datos indican que el tratamiento con R-compuesto B redujo la incidencia y la gravedad de la enfermedad. En el grupo de S-compuesto B, 1 de 5 animales desarrolló colitis. Este único animal aquejado tenía una puntuación de patología de colon de 9, lo que indica enfermedad grave. Los ratones no infectados y los tratados con CTLA4 no mostraron signos de enfermedad.

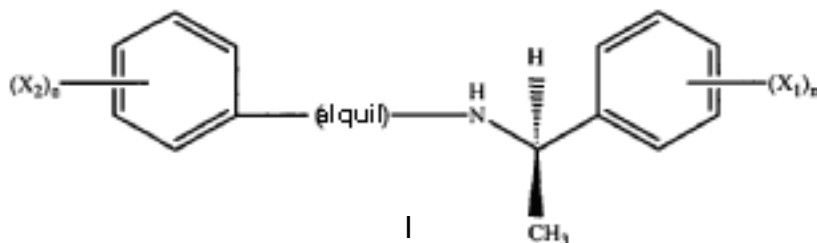
Los niveles séricos de calcio se redujeron significativamente en ambos grupos de tratamiento con R-compuesto B en comparación con los controles no infectados (figura 8). R-compuesto B a la dosis de 10 mg/kg también indujo reducciones de calcio significativas en comparación con los grupos de CTLA4 y control de vehículo. Los niveles de calcio en el grupo de S-compuesto B no fueron estadísticamente diferentes de cualquier otro grupo. Los niveles séricos de fósforo estaban significativamente elevados en el grupo de 10 mg/kg de R-compuesto B en comparación con todos los grupos control. La dosis de 3 mg/kg inferior indujo una elevación significativa en el fósforo sérico en comparación con el grupo tratado con S-compuesto B sólo. S-compuesto B indujo una reducción significativa en el fósforo en comparación con los animales tratados con CTLA4. En todos, estos datos demuestran que el compuesto calcimimético era biológicamente activo y que la dosis superior generaba efectos más pronunciados.

Finalmente, para proporcionar evidencia adicional en el suero de que el tratamiento con agente calcimimético ayudaba a prevenir la colitis, se midió un panel de citocinas y quimiocinas. De éstas, IP-10, una quimiocina que puede desempeñar un papel en la migración celular, era la más claramente afectada por el tratamiento con R-compuesto B (figura 9). La diferencia en la producción de IP-10 entre el grupo de 10 mg/kg de R-compuesto B y el grupo control de vehículo se aproximó a la significación ($p = 0,06$), pero en general no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos. Los niveles séricos de IP-10 estaban elevados en los animales tratados con vehículo que demostraron síntomas clínicos de enfermedad, y se correlacionaban con la gravedad de la enfermedad tal como se mide mediante la puntuación clínica. Esta correlación con la gravedad estaba presente en cada grupo de tratamiento. En los grupos de R-compuesto B y S-compuesto B se observó menos elevación de IP-10, lo que sugiere adicionalmente un beneficio protector.

En general, el tratamiento con R-compuesto B inhibió el desarrollo y la gravedad de la colitis en ratones *mdr1a*^{-/-}. Esto se confirmó tanto por la puntuación clínica e histopatológica como por la reducción de la quimiocina inflamatoria IP-10. En general, hay una tendencia definitiva, estadísticamente significativa en algunas de las mediciones usadas para realizar un seguimiento del desarrollo de la colitis, lo que sugiere que el tratamiento con compuestos calcimiméticos, tales como R-compuesto B, puede atenuar el desarrollo de la enfermedad.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto calcimimético según la fórmula I para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio del intestino (IBD), en el que el IBD es colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Chron (DC)



en la que:

X_1 y X_2 , que pueden ser idénticos o diferentes, son cada uno un radical elegido de radicales CH_3 , CH_3O , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, Br , Cl , F , CF_3 , CHF_2 , CH_2F , CF_3O , CH_3S , OH , CH_2OH , CONH_2 , CN , NO_2 , CH_3CH_2 , propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, t-butilo, acetoxilo y acetilo, o dos de X_1 pueden formar juntos una entidad elegida de anillos cicloalifáticos condensados, anillos aromáticos condensados y un radical metilendioxi, o dos de X_2 pueden formar juntos una entidad elegida de anillos cicloalifáticos condensados, anillos aromáticos condensados y un radical metilendioxi; siempre que X_2 no sea un radical 3-t-butilo;

n oscila entre 0 y 5;

m oscila entre 1 y 5; y

el radical alquilo se elige de radicales alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$, que están opcionalmente sustituidos con al menos un grupo elegido de grupos alquilo $\text{C}_1\text{-C}_9$, grupos dihidroindolilo y tiodihidroindolilo y grupos 2-, 3- y 4-piperidinilo saturados e insaturados, lineales, ramificados y cíclicos;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto calcimimético es N-(3-[2-clorofenil]-propil)-R- α -metil-3-metoxibencilamina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto calcimimético es cinacalcet HCl.
4. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto se administra con un agente antidiarreico, un agente antiespasmódico, un agente anticolinérgico, un agente analgésico, un compuesto 5-aminosalicílico, un inmunomodulador o un antibiótico.
5. Compuesto para su uso según la reivindicación 4, en el que el agente antidiarreico es loperamida o difenoxilato.
6. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto que va a tratarse es un mamífero o un ser humano.

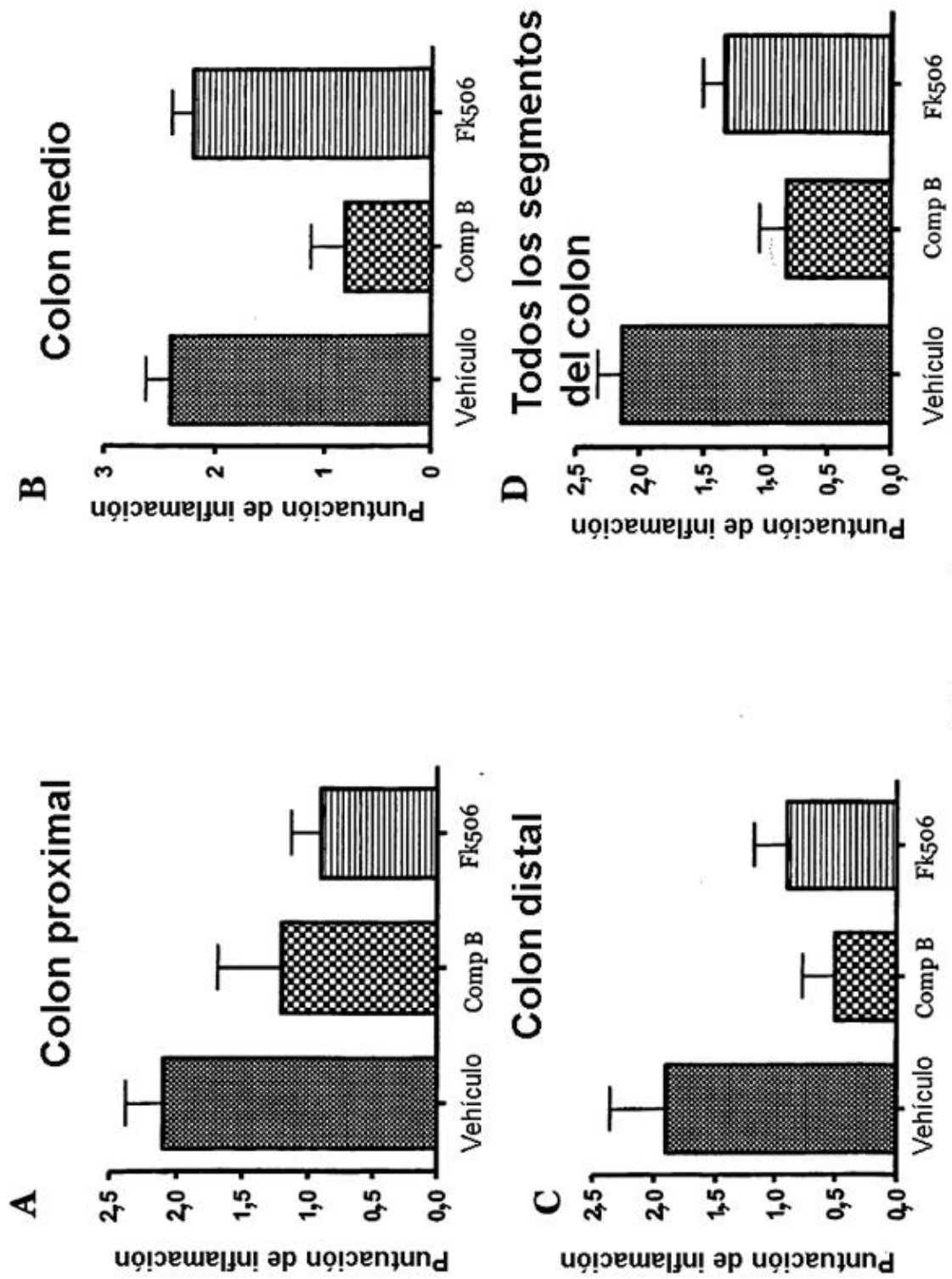


Figura 1

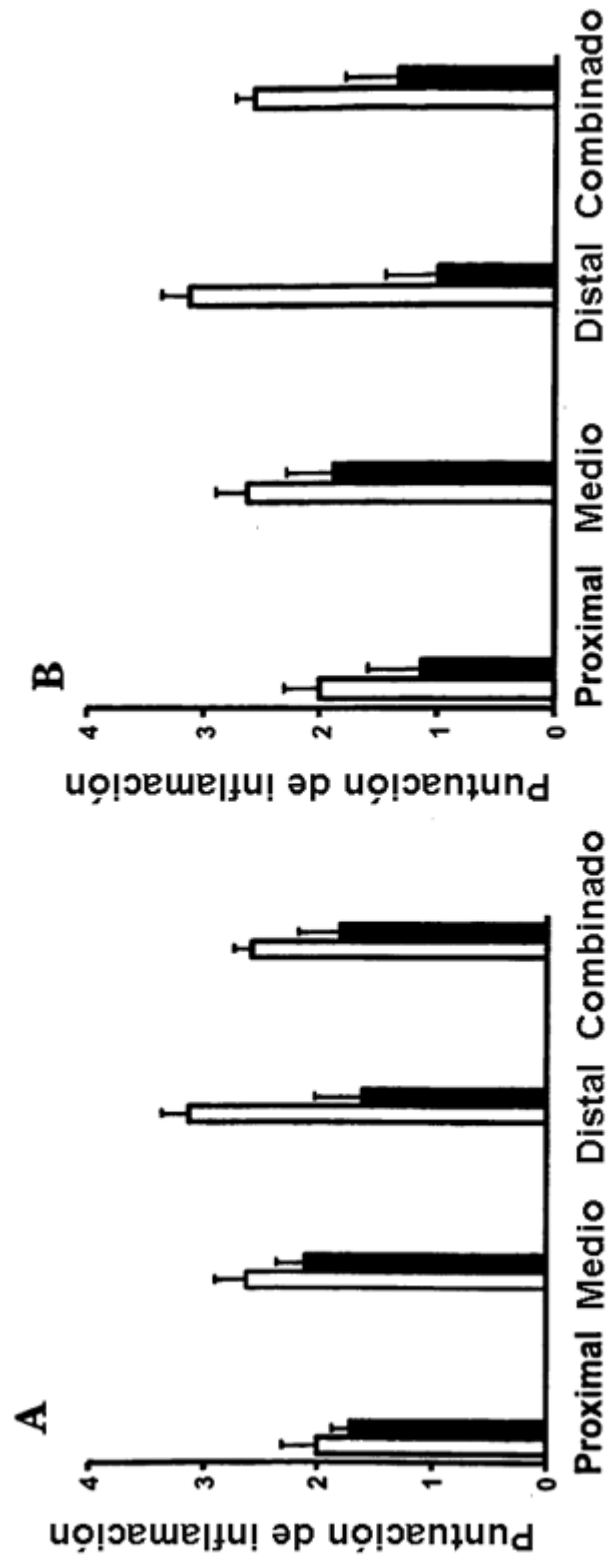


Figura 2

Figura 3

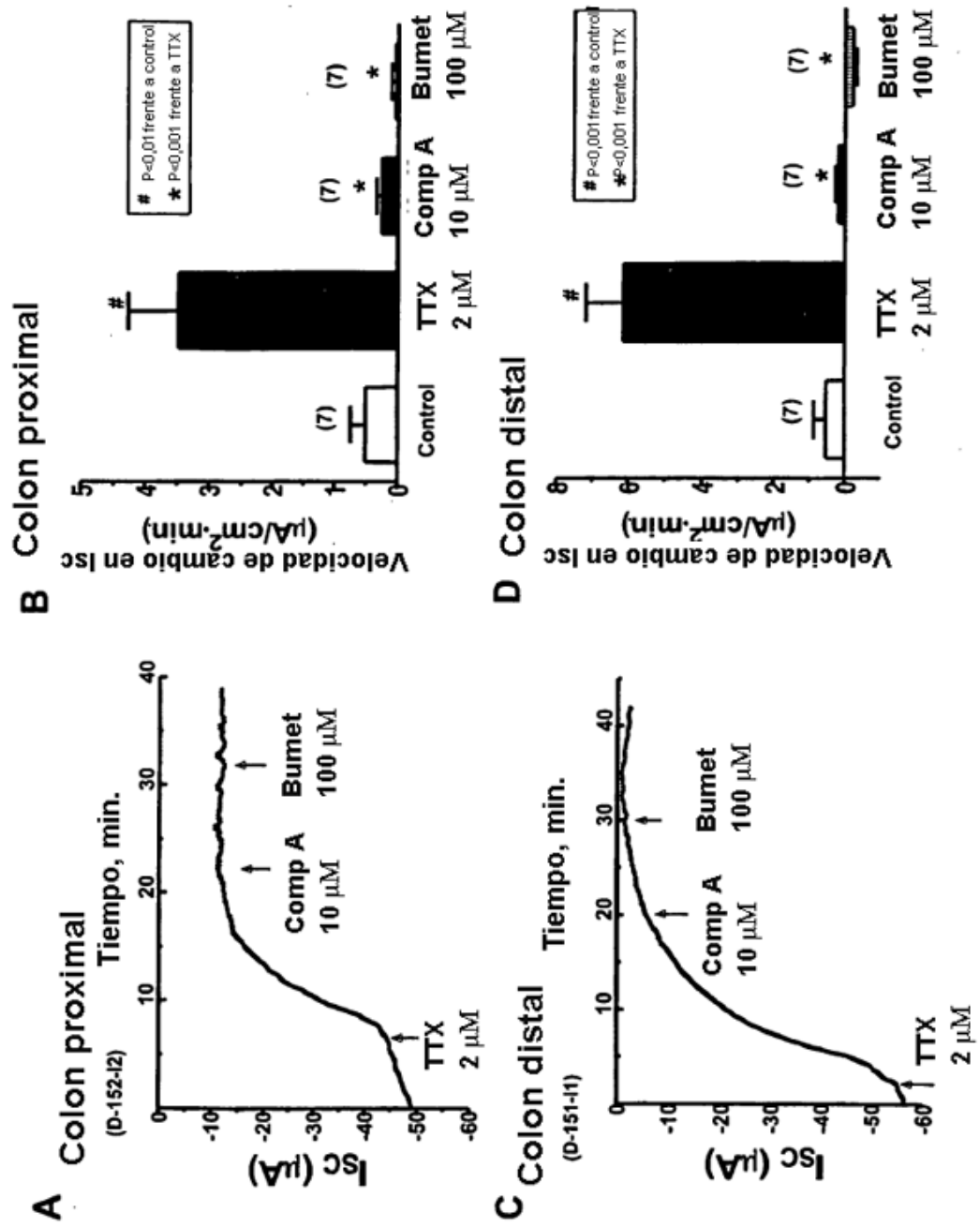
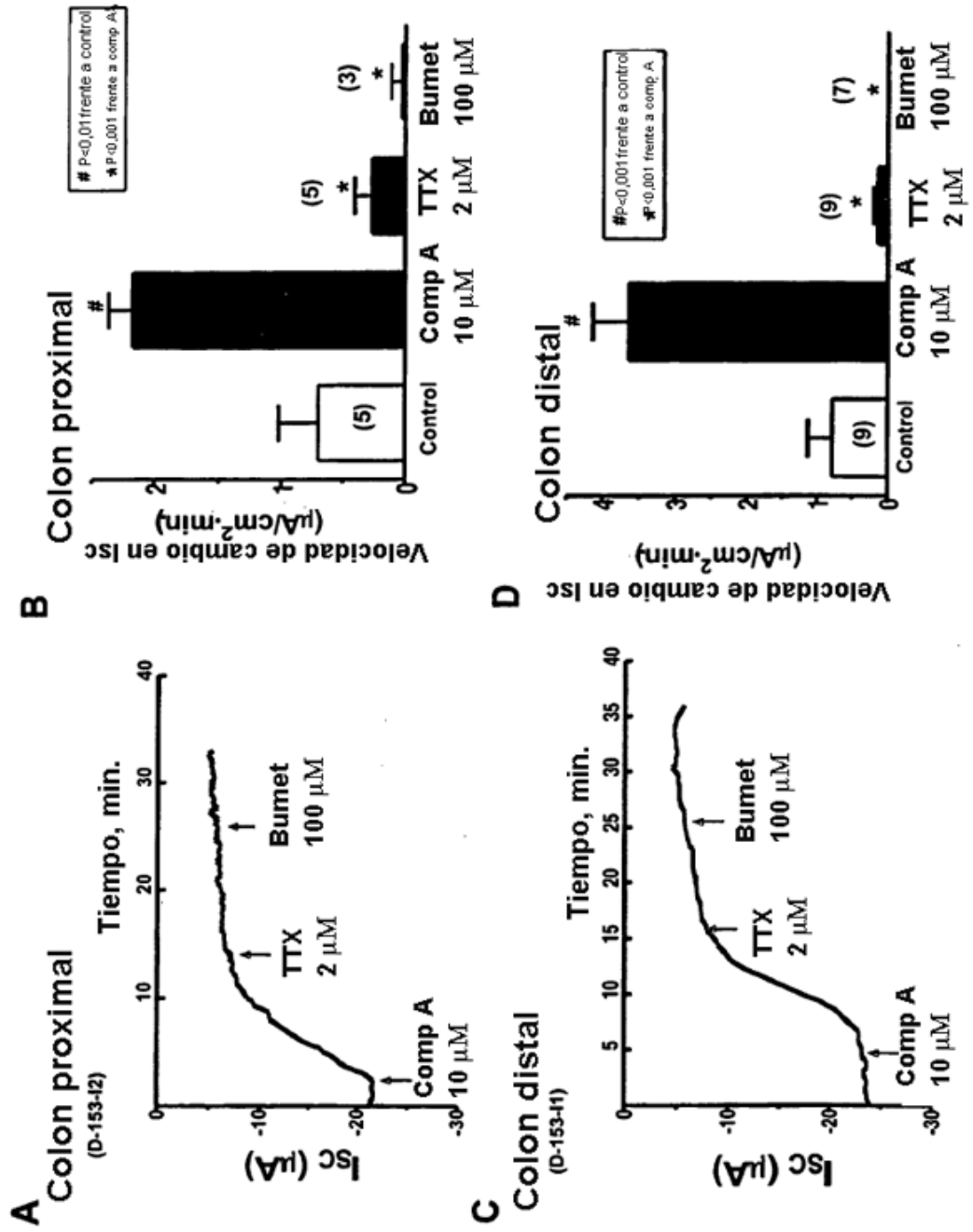


Figura 4



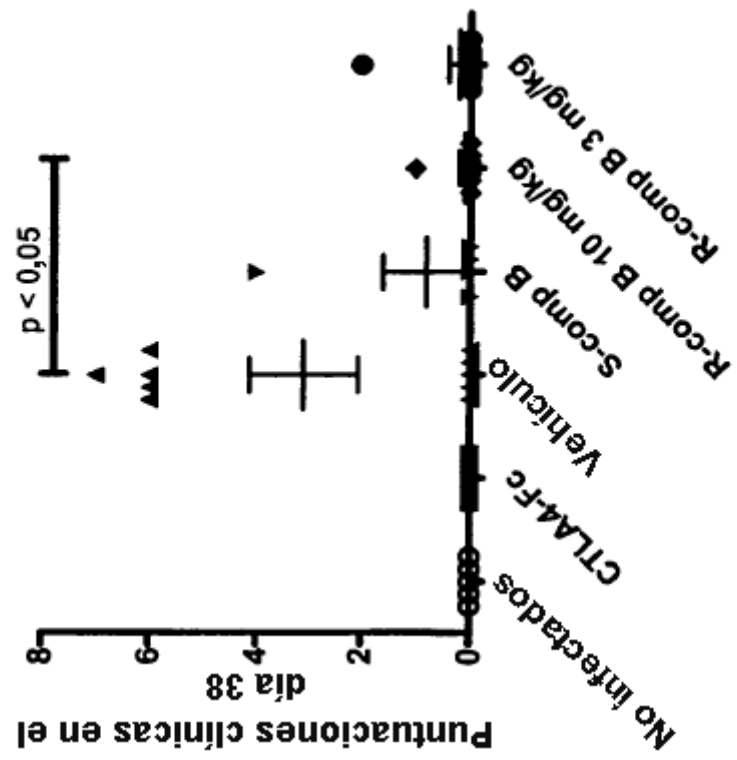


Figura 5

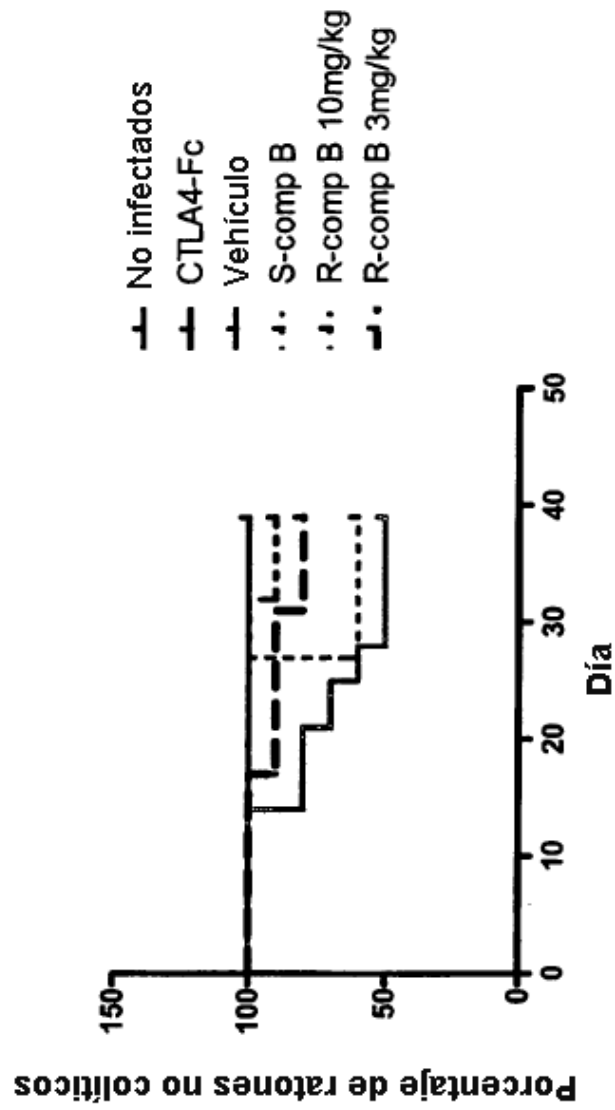


Figura 6

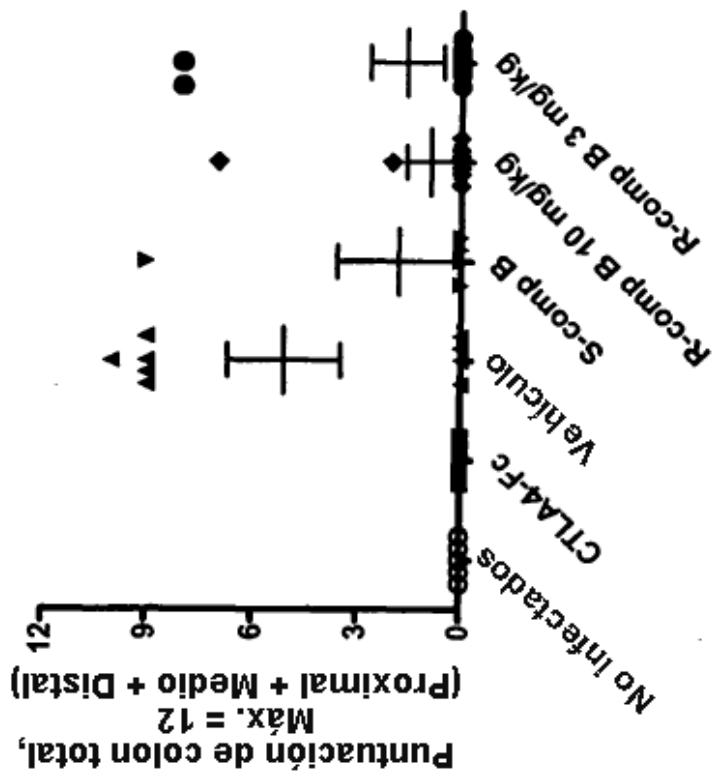


Figura 7

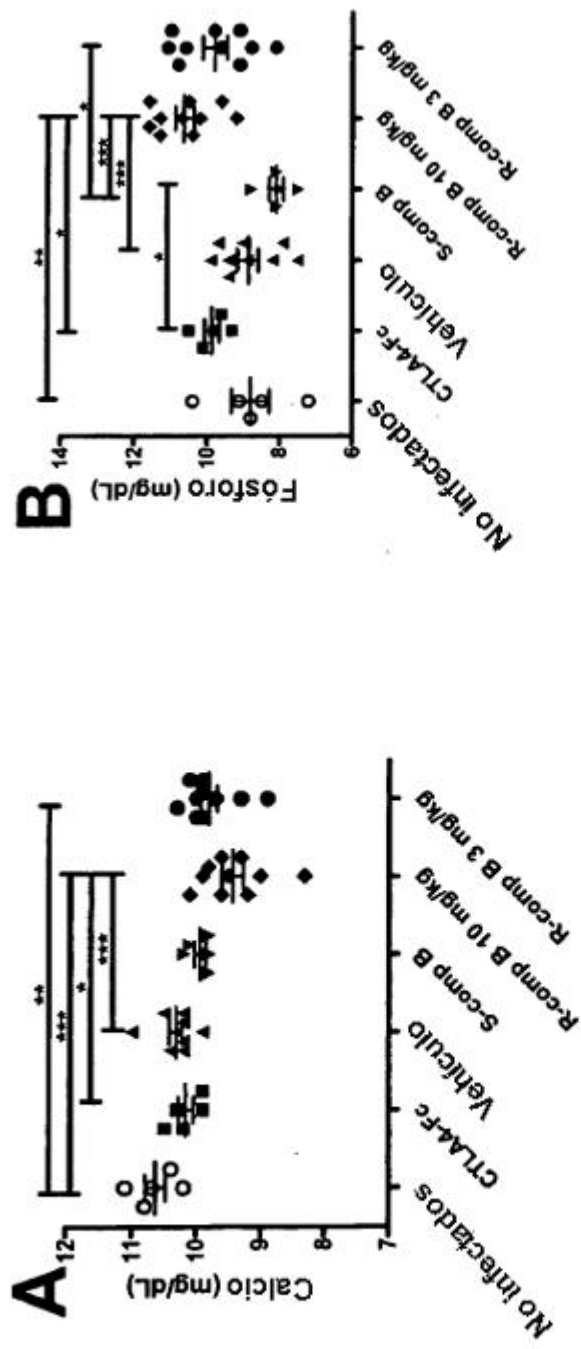


Figura 8

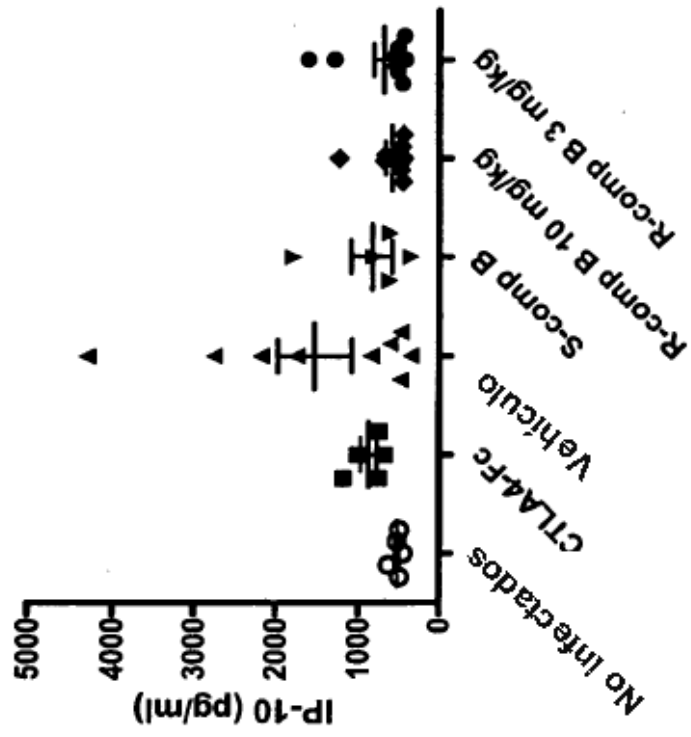


Figura 9